

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Caracterização dos domínios da proteína
adaptadora Ezrina essenciais à estabilização
membranar do canal CFTR-F508del**

Vanessa Isabel Rodrigues Neno

Mestrado em Bioquímica
Especialização em Bioquímica Médica

Dissertação orientada por:
Doutor Paulo Matos

2017

Agradecimentos

O último ano e este projeto de mestrado foi uma grande e das melhores etapas da minha vida, à qual me dediquei o mais que pude. Para além de me ter permitido evoluir profissionalmente e ter sido uma mais-valia a nível pessoal, fez-me ter a certeza que é o trabalho de bancada, a investigação e a possibilidade de melhorar a qualidade de vida humana que me fascina nesta área que escolhi.

Nem sempre foi fácil, nem sempre as coisas correm como esperamos e até uma clonagem, que parece uma coisa simples, pode dar muitas dores de cabeça. No entanto, esta aprendizagem e enriquecimento não seria possível, nem tão valiosa, sem todos os que me rodearam durante estes 12 meses.

Antes de mais, tenho de agradecer, e muito, ao Prof. Paulo Matos por me ter aceitado neste projeto, por me ter sempre motivado com a sua boa disposição e por estar sempre disponível para me ajudar e paciente para esclarecer as minhas dúvidas. Ao Doutor Peter Jordan tenho também a agradecer muito por me ter acolhido no seu grupo e por estar sempre atento. Fui uma sortuda por ter tido a oportunidade de me cruzar com este grupo! Tenho de agradecer muito à Ana por me ter também acolhido e me ter ensinado e ajudado em tudo quanto pôde; à Joana por me ter também acolhido desde o primeiro dia, por estar sempre atenta e pela ajuda e ensinamentos que me transmitiu; e à Patrícia pela paciência e disponibilidade em responder a todas as minhas perguntas, por vezes infinitas, e especialmente por toda a ajuda e tempo que me dedicou nas etapas finais deste trabalho experimental – mostraste-me que com garra e trabalho conseguimos alcançar os nossos objetivos. Por último, e não menos importante, quero deixar um agradecimento à Andreia, pela sua boa disposição, e à Vânia, à Cláudia e à Márcia que sempre se disponibilizaram para o que quer que eu precisasse. Todos vocês enriqueceram o meu último ano e considero um grande privilégio ter tido a possibilidade de trabalhar com pessoas tão excecionais.

Quero ainda agradecer à minha família e amigos pelo apoio, incentivo e por compreenderem as minhas ausências nestes últimos meses. Aos meus pais tenho a agradecer as pessoas incríveis que são, tudo quanto me têm proporcionado e por acreditarem sempre em mim; e ao meu irmão por ser um miúdo incrível, por me tornar numa pessoa melhor, por estar sempre atento e disponível para mim e pelo amor e confiança que mostra ter por mim. À Rita e à D. Mafalda não há palavras para agradecer toda a amizade e apoio, fazendo-me sempre sentir parte da vossa família, e à minha Mariazoca linda que tornou os meus dias sempre mais alegres e ricos com a sua maneira única e encantadora. À Inês, a melhor amiga que podia ter, por me compreender, encorajar e por estar sempre presente mesmo quando não fisicamente.

A todos vocês dedico esta minha pequena grande vitória e garanto que vos vou ter sempre presentes na minha vida.

Resumo

A Fibrose Quística (FQ) é a doença genética autossômica recessiva mais prevalente em Caucasianos. Esta doença é causada por mutações no gene *CFTR* que codifica a glicoproteína CFTR, um canal transportador de íons cloreto expresso em células epiteliais de vários órgãos. Atualmente estão identificadas cerca de 2000 mutações, sendo a mais comum a F508del - que corresponde à deleção do aminoácido fenilalanina na posição 508 e está presente em 90% dos doentes, em pelo menos um dos alelos. Esta mutação prejudica o *folding* e o tráfego do canal para a membrana plasmática (MP) afetando assim a função da CFTR. Ainda assim, a CFTR-F508del que consegue atingir a MP apresenta ainda defeitos no transporte de cloreto e na sua permanência e estabilidade na superfície das células. Consequentemente, a ausência funcional do canal CFTR nas células epiteliais causa deficiências em vários órgãos e sistemas, dos quais se destacam a insuficiência pancreática, a infertilidade masculina e os problemas respiratórios, de longe a manifestação com maior mortalidade, decorrente de infecções recorrentes e da inflamação crônica das vias respiratórias, que acabam por levar à falência pulmonar.

Nos últimos anos têm sido feitos diversos estudos para identificar estratégias que permitam corrigir e resgatar a CFTR-F508del para a MP. A pesquisa de compostos para este efeito – denominados “corretores” – levou à descoberta de várias novas moléculas. O corretor mais promissor é o composto VX-809 que permite corrigir parcialmente o *folding* da CFTR-F508del e, consequentemente, promove o seu resgate para a MP. Contudo, os ensaios clínicos para este composto não mostraram melhorias significativas na maturação da CFTR-F508del em biopsias rectais, nem na função pulmonar dos doentes. Estudos posteriores demonstraram que o canal corrigido é muito instável sendo rapidamente removido da MP por endocitose. O grupo de acolhimento tem investigado este fenómeno, procurando caracterizar os mecanismos moleculares envolvidos, por forma a encontrar estratégias que permitam estabilizar a CFTR-F508del corrigida com o VX-809 na MP.

Em estudos recentes do grupo mostrou-se que a ativação da proteína Ezrina e a interação do seu domínio FERM com a proteína NHERF1 estabilizam a CFTR-F508del corrigida farmacologicamente na MP através da formação do complexo macromolecular CFTR-NHERF1-Ezrina. Assim, o objetivo principal deste trabalho consistiu em identificar que subdomínios da proteína Ezrina são essenciais para esta estabilização da CFTR-F508del e utilizar esta informação para desenvolver um péptido recombinante bioativo. No desenho deste péptido de fusão foram ainda incluídos domínios de transdução proteica, de modo possibilitar a sua entrega às células alvo, e uma sequência péptido sinal eucariota, permitindo a sua síntese e secreção a partir de células de mamífero, o que possibilitou a sua produção e isolamento. Os resultados obtidos mostraram que o péptido bioativo produzido promove a estabilização na superfície celular da CFTR-F508del resgatada farmacologicamente. Foi também possível observar, através de imunofluorescência confocal, que o péptido de fusão é capaz de atravessar as membranas celulares e que possui um efeito autócrino ao ser secretado por células epiteliais brônquicas que expressam constitutivamente CFTR-F508del. Finalmente, o efeito aditivo do co-tratamento com VX-809 e a administração ectópica de péptido produzido em células HEK 293 foi demonstrado pelo aumento da atividade da CFTR-F508del em ensaios de influxo de iodeto.

O segundo objetivo deste trabalho consistiu em explorar a alteração conformacional da proteína adaptadora NHERF1, que determina a estabilização da CFTR-F508del resgatada na MP, para produzir um sensor de FRET que possa vir a ser utilizado em ensaios de alto rendimento na pesquisa de alternativas químicas ou bioquímicas ao péptido bioativo produzido. Os resultados preliminares demonstraram a viabilidade do método, mas evidenciaram a necessidade de restringir a localização do sensor à MP para permitir a automação da metodologia em ensaios de alto rendimento.

Por fim, analisou-se a expressão da GTPase variante RAC1b em amostras de tecido pulmonar, comparando indivíduos saudáveis com doentes de FQ (F508del^{+/+}). A RAC1b é uma variante de *splicing* com propriedades antagónicas da GTPase RAC1, molécula que participa na ativação da Ezrina e é necessária à estabilização endógena da CFTR na MP. Os resultados obtidos não evidenciaram qualquer aumento de expressão desta variante em pulmões FQ F508del^{+/+}. Não obstante, ao dosear-se a expressão de citoqueratina 8, verificou-se que a composição epitelial das amostras FQ era deficitária, pelo que a expressão de RAC1b detetada pode encontrar-se subestimada.

Assim, pensa-se que os objetivos propostos para este trabalho de mestrado foram predominantemente atingidos, quer no que respeita ao desenvolvimento do péptido bioativo derivado da Ezrina, quer ao nível da construção e testes preliminares do sensor de FRET baseado na NHERF1. Assim, só não foi possível cumprir integralmente o último objetivo, pois a análise dos níveis de expressão de RAC1b em tecidos epiteliais brônquicos de doentes com FQ (F508del^{+/+}) revelou-se inconclusiva.

Palavras-chave: Fibrose quística, CFTR-F508del, VX-809, Ezrina, péptidos bioativos.

Abstract

Cystic Fibrosis (CF) is the most common autosomal recessive genetic disease in the Caucasian population. This disease is caused by mutations in the *CFTR* gene which encodes the CFTR glycoprotein, a chloride channel expressed in the epithelial cells of several organs. Currently, over 2000 CF-associated mutations have been identified but the most common is F508del, which corresponds to a deletion of a phenylalanine at position 508 and is present at least in one allele in almost 90% of the patients. This mutation affects CFTR function by reducing the folding and trafficking of the channel to the plasma membrane (PM). Moreover, the little F508del-CFTR protein that reaches the PM exhibits defective chloride transport and a much reduced stability at the PM. Consequently, the absence of functional CFTR channels causes disabilities in several organs and systems, including pancreatic insufficiency, male infertility and, by far the most life threatening manifestation, respiratory problems due to chronic airway infection and inflammation that can lead to respiratory failure.

Intense research in the last decades led to the identification of several compounds that can, at least, partially correct the basic defect in F508del-CFTR folding and rescue its expression to the PM. Among these compounds – termed “correctors” – the most promising so far has been VX-809, also known as lumacaftor. However, clinical trials with this drug didn't show a statistically significant improvement in F508del-CFTR maturation on rectal biopsies or in pulmonary function. Further studies have shown that the corrected channel had fast turnover, being rapidly removed from the PM by endocytosis. The host group has investigated this effect, trying to characterize the molecular mechanisms involved, in order to find strategies to stabilize VX-809-corrected F508del-CFTR at the PM.

Recent studies by the group have shown that the activation of the adaptor protein Ezrin and its interaction with the scaffold NHERF1 results in the stabilization of VX-809-corrected F508del-CFTR at the PM, through the formation of the macromolecular complex CFTR-NHERF1-Ezrin. Thus, the main goal of this work was to identify which of Ezrin's subdomains were essential for rescued F508del-CFTR stabilization at the PM and use this results to design a novel bioactive peptide. The design of this peptide includes several molecular features that enable its synthesis and secretion from mammalian cells and its self-delivery to target cells. The results obtained showed that the produced bioactive peptide promotes the stabilization of pharmacologically rescued-F508del-CFTR at the PM. It was also possible to see, through confocal immunofluorescence, that the peptide could cross the target cell membrane and had an autocrine effect when secreted by bronchial epithelial cells that constitutively express F508del-CFTR. Finally, the additive effect of the co-treatment with VX-809 and the bioactive peptide produced in HEK 293 cells was demonstrated by the enhanced activity of F508del-CFTR in iodide influx assays.

The second goal of this work was to study the conformational changes of NHERF1 adaptor protein that determines the rescued-F508del-CFTR stabilization at the PM, to produce a FRET sensor which may be used in high-throughput screening in the search for chemical or biochemical alternatives to the bioactive peptide produced. Preliminary designs of the sensor demonstrated sensitivity to Ezrin activation, but evidenced the need to restrict the localization of the sensor to the PM to allow the automation of the methodology in high-throughput screening.

Finally, we analysed the expression of the RAC1 GTPase splice variant, RAC1b, on pulmonary tissues samples, comparing healthy individuals with CF patients (F508del^{+/+}). The RAC1b has properties that antagonise RAC1 signalling, and could thus hinder endogenous Ezrin activation destabilizing the CFTR channels at the PM. However, the obtained data didn't show any increase of the expression of this variant in F508del^{+/+} lungs.

Thus, the proposed goals of this master's thesis work were predominantly achieved, regarding the development of the Ezrin-derived bioactive peptide and the preliminary designs of the NHERF1-based FRET sensor. However, the analysis of RAC1b expression levels on bronchial tissues of F508del^{+/+} CF patients revealed no significant differences when compared to healthy controls.

Keywords: Cystic Fibrosis, F508del-CFTR, VX-809, Ezrin, bioactive peptides

Índice

Agradecimentos	ii
Resumo	iii
Abstract	v
Índice	vii
Índice de Figuras	ix
Índice de Tabelas	xi
Lista de Abreviaturas	xii
1. Introdução	1
1.1 Fibrose Quística	1
1.1.1 Fisiopatologia da doença	1
1.1.2 A Proteína CFTR	2
1.1.3 Mutações	3
1.1.4 A mutação F508del	5
1.1.5 Corretores e Potenciadores	5
1.1.6 Estabilidade na Membrana Plasmática	6
1.2 Ezrina	8
1.3 Domínio de transdução da proteína Tat (TAT)	10
1.4 Objetivos	10
2. Materiais e Métodos	12
2.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	12
2.1.1 Análise da expressão de RAC1b e CK8 em tecidos homozigóticos CFTR-F508del	12
2.1.2 Eletroforese em géis de agarose	13
2.2 Clonagem	13
2.2.1 Subclonagem no vector TOPO	15
2.2.2 Sequenciação	16
2.3 Cultura de células	16
2.3.1 Transfecção celular	18
2.3.2 Produção dos péptidos de fusão TAT	20
2.3.3 Clones estáveis	20
2.4 Eletroforese SDS-PAGE e <i>Western Blot</i>	21
2.5 Biotinilação de Proteínas na Superfície Celular	24
2.6 Ensaio de influxo de iodeto	25

2.6.1	Quantificação do decréscimo de fluorescência e taxas de influxo	26
2.7	Imunofluorescência e microscopia confocal	26
2.7.1	Localização do péptido de fusão TAT-CFP nas células.....	26
2.8	Transferência de energia por ressonância de Förster (FRET).....	27
2.8.1	Estudo da conformação da proteína NHERF1-ΔPDZ1	27
2.9	Análise estatística.....	28
3.	Resultados.....	29
3.1	Estabilidade da CFTR-F508del na membrana plasmática.....	29
3.1.1	Efeito dos subdomínios FERM da proteína Ezrina.....	29
3.2	Construção de um péptido de fusão TAT	32
3.2.1	Estudo da expressão e função autócrina do péptido de fusão TAT-FERM2 em células CFBE F508del	33
3.2.2	Escolha da linha celular para produção do péptido de fusão TAT-FERM2.....	34
3.2.3	Localização celular do péptido de fusão TAT-CFP	36
3.2.4	Efeito do péptido de fusão TAT-FERM2 na atividade da CFTR-F508del.....	37
3.2.5	Clones estáveis dos péptidos de fusão em células HEK 293	39
3.3	Estudo do sensor de FRET CFP-NHERF1ΔPDZ1-YFP.....	40
3.4	Estudo dos níveis de expressão de RAC1b em tecidos brônquicos derivados de doentes com FQ homozigóticos para a mutação F508del.....	42
4.	Discussão dos Resultados, Conclusões e Perspetivas Futuras	45
5.	Referências Bibliográficas.....	49
6.	Anexos.....	54
6.1	<i>Primers</i> utilizados ao longo do trabalho.....	54
6.2	Construção do péptido de fusão TAT-FERM2.....	55

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Cascata de consequências que levam à insuficiência respiratória em doentes com FQ.....	2
Figura 1.2 - Estrutura da proteína CFTR.....	3
Figura 1.3 - Sistematização dos efeitos e defeitos funcionais causados pelas 6 classes de mutações na síntese e expressão da CFTR.....	4
Figura 1.4 - Estabilização da CFTR na MP via RAC1 e HGF.....	7
Figura 1.5 - Estrutura da Ezrina.....	8
Figura 1.6 - Esquema do complexo macromolecular envolvido na estabilização da CFTR na membrana plásmica e ancoragem ao citoesqueleto de actina regulado pela Ezrina.....	9
Figura 2.1 - Esquematização da montagem da <i>sandwich</i> a utilizar na técnica de Western Blot.....	22
Figura 3.1 - A) Representação da estrutura molecular do domínio FERM da proteína Ezrina (adaptado de <i>Protein Database - PDB 1gg3 EBI</i>); B) Esquema da estrutura da proteína Ezrina e das várias construções de deleção da Ezrina clonadas no vector pECFP-C3.....	30
Figura 3.2 - Efeito dos subdomínios da Ezrina na estabilidade da CFTR-F508del na MP...	31
Figura 3.3 - Análise do efeito dos subdomínios da Ezrina na estabilização da CFTR-F508del tratada com VX-809 na MP.....	31
Figura 3.4 - Esquema da constituição dos péptidos de fusão TAT-FERM2 e TAT-CFP.....	33
Figura 3.5 - Estudo da expressão e do efeito autócrino do péptido de fusão TAT-FERM2 em células CFBE F508del.....	34
Figura 3.6 - Estudo da produção do péptido de fusão TAT-FERM2 em células BHK.....	35
Figura 3.7 - Estudo da produção do péptido de fusão TAT-FERM2 em células HEK 293...	35
Figura 3.8 - Localização do péptido TAT-CFP em células CFBE F508del e efeito do péptido de fusão TAT-FERM2 na CFTR-F508del resgatada com VX-809.....	36
Figura 3.9 - Análise do ensaio de influxo de iodeto.....	37
Figura 3.10 - Taxas iniciais de influxo do iodeto.....	38
Figura 3.11 - Análise dos níveis de expressão dos péptidos de fusão, TAT-CFP e TAT-FERM2, dos clones estáveis de HEK 293 por WB.....	39
Figura 3.12 - Aplicação da técnica de FRET no estudo da conformação da proteína NHERF1ΔPDZ1.....	40
Figura 3.13 - Análise do sensor de FRET CFP-NHERF1ΔPDZ1-YFP por microscopia de fluorescência confocal.....	41
Figura 3.14 - Estudo dos níveis de expressão de RAC1b em amostras de epitélio brônquico de pessoas saudáveis (CFTR <i>wt</i>) e de doentes com FQ e homozigóticos para a mutação F508del (CFTR F508del ^{+/+}).....	43

Figura 3.15 - Estudo dos níveis de expressão de CK8 em amostras de epitélio brônquico de pessoas saudáveis (CFTR *wt*) e de doentes com FQ e homozigóticos para a mutação F508del (CFTR F508del^{+/+})..... 44

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 - Condições de transfeção para cada linha celular.	19
Tabela 2.2 - Anticorpos utilizados em <i>Western Blot</i> e respectivas diluições e tempo de incubação.	23
Tabela 6.1 - Sequências dos <i>primers</i> utilizados nos PCR para avaliar os níveis de expressão de Rac1b e CK8 e respectivas temperaturas de <i>annealing</i> e número de ciclos utilizados.	54
Tabela 6.2 - Sequências dos <i>primers</i> utilizados na amplificação do CFP para a clonagem no vector pCR™2.1-TOPO® e respectivas temperaturas de <i>annealing</i> e número de ciclos realizado..	54
Tabela 6.3 - Sequências dos <i>primers</i> utilizados nas etapas de <i>screening</i> das clonagens e respectivas temperaturas de <i>annealing</i> e número de ciclos realizado.....	54
Tabela 6.4 - Sequências dos <i>primers</i> utilizados nas reações de sequenciação e respectivas temperaturas de <i>annealing</i> e número de ciclos realizado.....	55

Lista de Abreviaturas

A260nm	Absorvância a 260 nm
A280nm/A260nm	Razão das absorvâncias a 280 nm e 260nm
ABC	<u>A</u> TP- <u>b</u> inding <u>c</u> assette
ATP	Adenosina trifosfato
BHK	<u>B</u> aby <u>H</u> amster <u>K</u> idney cells
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
cAMP	3',5'- monofosfato de adenosina cíclico
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CFBE	<u>C</u> ystic <u>F</u> ibrosis <u>B</u> ronchial <u>E</u> pithelial cells
CFP	Proteína Fluorescente Azul (<u>C</u> yan <u>F</u> luorescent <u>P</u> rotein)
CFTR	<u>C</u> ystic <u>F</u> ibrosis <u>T</u> ransmembrane <u>C</u> onductance <u>R</u> egulator
CK8	Citoqueratina 8
Cl ⁻	Ião cloreto
CO ₂	Dióxido de carbono
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DMEM F-12	Meio Eagle Modificado por Dulbecco com Mistura de Nutrientes F-12
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Tetra-acetato de etileno diamina
EGTA	<i>Ethylene Glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-Tetraacetic acid</i>
F508del	Deleção do aminoácido Fenilalanina na posição 508 da CFTR
FBS	Soro fetal bovino (<u>F</u> etal <u>B</u> ovine <u>S</u> erum)
FERM	<u>F</u> our-point-one, <u>E</u> zrin, <u>R</u> adixin, <u>M</u> oesin
FQ	Fibrose quística
FRET	Transferência de Energia por Ressonância de Förster
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HEK 293	<u>H</u> uman <u>E</u> mbryonic <u>K</u> idney 293 cells
HIV-1	Vírus da Imunodeficiência Humana (<u>H</u> uman <u>I</u> mmunodeficiency <u>V</u> irus 1)
I ⁻	Ião iodeto
IF	Imunofluorescência
kDa	Kilodalton
LB	Meio Luria-Bertani
m/v	Massa por volume

MEM	Meio Mínimo Essencial
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MP	Membrana plasmática
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MSD	<u>M</u> embrane- <u>S</u> panning <u>D</u> omain
Na ⁺	lão sódio
NBD	<u>N</u> ucleotide- <u>B</u> inding <u>D</u> omain
NHERF1	<u>N</u> a ⁺ / <u>H</u> ⁺ <u>E</u> xchanger <u>R</u> egulatory <u>F</u> actor isoform-1
NMD	<u>N</u> onsense- <u>M</u> ediated <u>D</u> ecay
O/N	<i>Overnight</i>
pb	Pares de bases
PBS	Tampão fostato salino (<u>P</u> hosphate- <u>B</u> uffered <u>S</u> aline)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction)
PFA	Parafolmaldeído
PIP2	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
RAC1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
SB	<u>S</u> ample <u>B</u> uffer
SDS	Dodecilsulfato de sódio (<u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulfate)
Tat	<u>T</u> rans- <u>a</u> ctivator of <u>t</u> ranscription Protein
TAT	Domínio de transdução da Tat
TBE	Tampão <u>T</u> ris- <u>B</u> orato- <u>E</u> DTA
TBS	<u>T</u> ris- <u>B</u> uffered <u>S</u> aline
TRITC	Isotiocianato de Tetrametilrodamina
V	Volts
v/v	Volume por volume
WB	<u>W</u> estern <u>B</u> lot
wt	<i>wild type</i>
YFP	Proteína Fluorescente Amarela (<u>Y</u> ellow <u>F</u> luorescent <u>P</u> rotein)
ΔCt	Delta C-terminal

1. Introdução

1.1 Fibrose Quística

A fibrose quística (FQ) é uma doença genética autossómica recessiva causada por uma mutação num gene do braço longo do cromossoma 7 (7q31)¹ que codifica a proteína CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), uma proteína de membrana transportadora de iões cloreto (Cl⁻)^{2,3}.

Esta é uma doença comum em caucasianos e estima-se que em Portugal tenha uma incidência de 1:8000 recém-nascidos⁴, afetando mais de 70 000 indivíduos em todo o mundo^{5,6}.

1.1.1 Fisiopatologia da doença

A FQ é uma doença sistémica uma vez que a CFTR é expressa em células epiteliais de vários órgãos, sendo que a manifestação clínica mais comum e causadora da maior taxa de mortalidade é a doença pulmonar⁷.

Em condições normais, a CFTR é responsável por manter a homeostase iónica nas células através do transporte de Cl⁻ assim como por regular a absorção de sódio (Na⁺) pelos canais de sódio epiteliais⁵. Quando na presença de proteína CFTR disfuncional, a homeostase iónica nos pulmões é prejudicada assim como a hidratação das vias aéreas. Consequentemente, ocorre um aumento da viscosidade do muco que leva à obstrução das vias respiratórias, originando assim um ambiente propício a infeções bacterianas (a mais frequente sendo por *Pseudomonas aeruginosa*) e inflamação crónica⁵. Em última instância e em casos mais graves esta condição pode culminar em falência respiratória (Figura 1.1)^{5,8}.

Outras complicações incluem insuficiência pancreática, presente em 85% dos pacientes e associada à absorção anómala de nutrientes e subnutrição, infertilidade masculina e concentrações anormais de eletrólitos no suor^{7,9}, sendo que um dos critérios de diagnóstico de FQ é uma concentração de iões cloreto elevada no suor (superiores a 60 mmol/L)⁵.

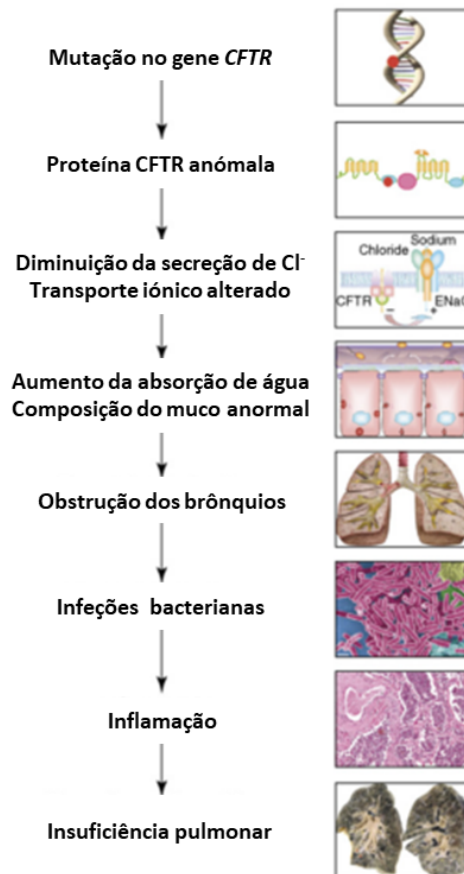


Figura 1.1 - Cascata de consequências que levam à insuficiência respiratória em doentes com FQ. Adaptado de ¹⁵.

1.1.2 A Proteína CFTR

A proteína CFTR é constituída por 1480 aminoácidos² e está estruturalmente dividida em cinco domínios: dois domínios membranares MSD, compostos por 6 segmentos transmembranares cada um, que delimitam fisicamente o poro na membrana plasmática (MSD1 e MSD2 - *membrane-spanning domain*), dois domínios citosólicos NBD (*nucleotide-binding domain*) responsáveis pela ligação e hidrólise do ATP, e uma região reguladora – denominada por domínio R – que interliga os domínios anteriores e regula a atividade do canal através de fosforilações dos seus múltiplos resíduos de serina que formam regiões consensos de fosforilação^{2,10}.

A CFTR pertence à família dos transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) uma vez que utiliza a energia proveniente da hidrólise de ATP para transportar Cl^- através da membrana plasmática (MP)¹⁰. A sua função é regulada por 3',5'-monofosfato de adenosina cíclico (cAMP)¹¹, uma vez que o canal é ativado após a fosforilação dos múltiplos resíduos de serina do domínio R por uma proteína cinase dependente de cAMP – a proteína cinase A (PKA). Deste modo, a atividade do canal é controlada pelo equilíbrio entre a ação regulatória de cinases e fosfatases na célula, assim como pela disponibilidade de ATP¹⁰.

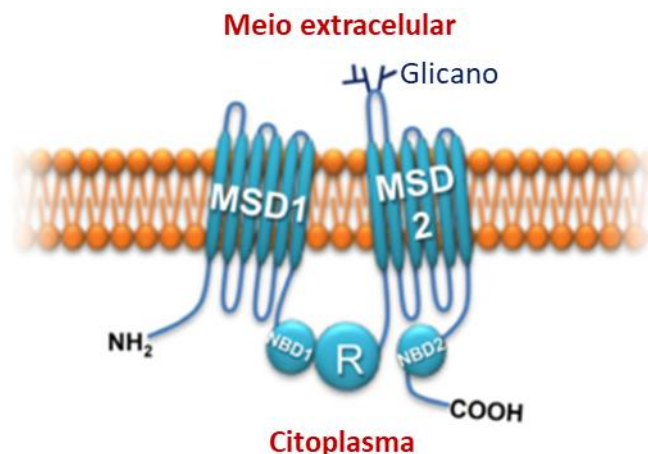


Figura 1.2 - Estrutura da proteína CFTR. A CFTR é constituída por dois motivos idênticos compostos por um domínio transmembranar e um domínio de ligação a nucleótidos, que estão ligados pela região reguladora R. Adaptado de ⁶.

Em 1990, Gregory *et al.*¹¹, ao estudarem a expressão da CFTR, concluíram que a proteína sofria modificações pós-traducionais até atingir a sua forma nativa, ao identificarem, através de eletroforese, 3 bandas correspondentes à proteína: banda A, B e C. A banda A é a forma mais simples da proteína, com aproximadamente 130 kDa, que corresponde ao produto da tradução do gene *CFTR*. A banda B, com cerca de 135 kDa, corresponde ainda a uma forma imatura da proteína, glicosilada nos resíduos de asparagina nas posições 894 e 900, ainda no retículo endoplasmático (RE). A banda C, de aproximadamente 180 kDa, corresponde finalmente à forma madura da CFTR, após ter sido alvo de novas glicosilações no complexo de Golgi, sendo então transportada para a MP^{11,12}.

1.1.3 Mutações

Estão descritas cerca de 2000 mutações que afetam a síntese, o processamento, o transporte e a função da proteína assim como a sua estabilidade na MP. Com base nos efeitos e defeitos funcionais causados, as mutações da CFTR foram agrupadas em 6 classes (Figura 1.3)^{6,13}.

As mutações de classe I são aquelas que levam a uma baixa produção de proteína causada por mutações *nonsense*, isto é, mutações que criam codões STOP prematuros. Consequentemente, a fim de evitar a produção e acumulação de proteínas truncadas, as células ativam um mecanismo (*nonsense-mediated decay* – NMD) que degrada o mRNA mutante. Dentro desta classe insere-se a mutação G542X, a segunda mais comum em doentes com FQ, com especial prevalência nos países mediterrânicos¹⁴.

Na classe II estão inseridas as mutações que afetam o processamento das proteínas levando a proteínas *misfolded*. À semelhança do que acontecia anteriormente, as proteínas com o *folding* incorreto são reconhecidas por um mecanismo de controlo de qualidade do retículo endoplasmático (ERQC) e “marcadas” para serem degradadas pelo proteossoma via ubiquitinação, o que implica que as proteínas não sejam capazes de alcançar a MP. Nesta classe está inserida a mutação mais comum em doentes com FQ, a F508del¹⁴.

Já a classe III inclui mutações que afetam a abertura, ou *gating*, do canal na membrana. Estas mutações estão maioritariamente localizadas nos domínios NBD afetando assim a ligação e hidrólise do ATP o que impede que o canal desempenhe corretamente a sua função. É exemplo desta classe a terceira mutação mais comum, a G551D⁶.

A classe IV agrupa as mutações que causam uma diminuição do fluxo de iões Cl^- através do canal. Localizam-se normalmente nos domínios membranares (MSD1 e MSD2) sendo exemplos as mutações R334W e R347P que causam uma redução de 60 e 70%, respetivamente, no fluxo de iões^{6,14}.

Mutações que levam a uma redução dos níveis de proteína desencadeada por processos de *splicing* alternativo ou, ainda que menos frequente, por alterações na sequência do promotor estão inseridas nas mutações de classe V¹⁴.

Finalmente, a classe VI inclui mutações que diminuem a retenção e estabilidade da CFTR na MP. Está também inserida nesta classe a mutação F508del, que quando resgatada para a MP apresenta um tempo de meia vida inferior comparativamente com a proteína não mutada¹³.

Perceber a causa-efeito de cada mutação e agrupá-las tendo em conta semelhanças no seu mecanismo de disfunção é uma estratégia indispensável na investigação de possíveis alvos terapêuticos, uma vez que é expectável que mutações com consequências funcionais similares possam ser corrigidas de forma semelhante^{13,15}.

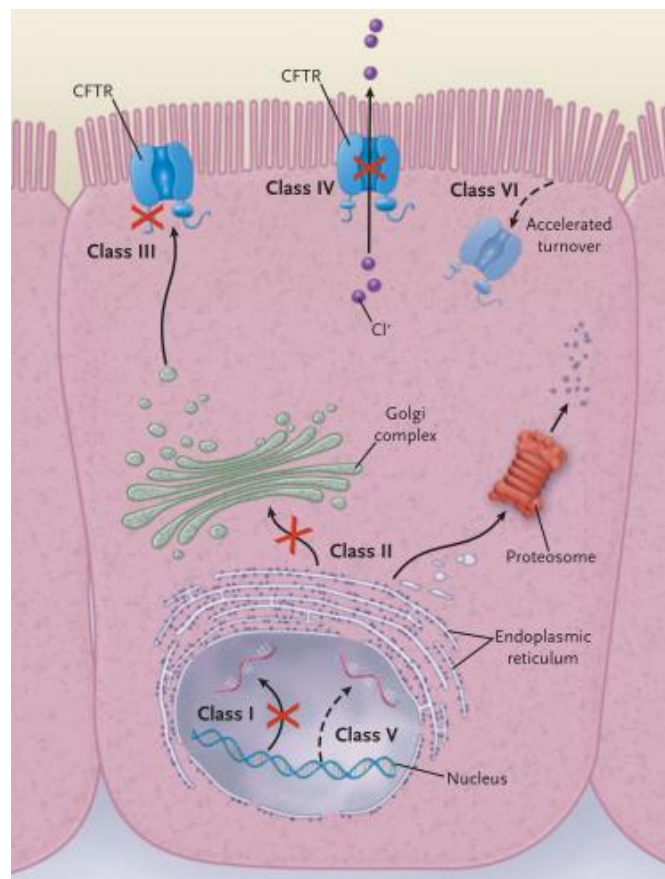


Figura 1.3 - Sistematização dos efeitos e defeitos funcionais causados pelas 6 classes de mutações na síntese e expressão da CFTR. Retirado de ⁸.

1.1.4 A mutação F508del

A mutação F508del corresponde à deleção do codão para o aminoácido fenilalanina na posição 508 da proteína CFTR. Esta é a mutação causadora de FQ mais comum com uma incidência de 90% em pelo menos um dos alelos do gene, pelo que tem sido uma mutação bastante estudada¹⁵.

Esta mutação localiza-se no domínio NBD1 da proteína CFTR e uma das explicações é que a mutação afete diretamente o *folding* deste domínio, sendo o aminoácido em falta, assim como a cadeia polipeptídica próxima dessa região, crucial para o folding¹⁶. Desta forma, como a proteína não consegue adquirir a sua correta conformação é reconhecida pela maquinaria de controlo de qualidade do retículo endoplasmático (RE), ubiquitinada e degradada pelo proteassoma¹⁵.

Como a proteína mutada é retida no RE e consequentemente não é transportada para o complexo de Golgi, esta não passa pelo processo final de maturação, não atingindo a sua forma madura completamente glicosilada. Por esta razão, em *Western blot* apenas é detetada a banda B, que corresponde à forma parcialmente glicosilada no RE, mas não é detetada banda C^{12,16}.

No entanto, Denning *et al.*¹⁷ descobriram que o processamento da CFTR-F508del é sensível à temperatura. Quando células epiteliais que expressem CFTR-F508del são colocadas a crescer a baixas temperaturas, os investigadores observaram um aumento da banda C, ou seja, de proteína completamente glicosilada. No entanto, quando as células retornam à sua temperatura fisiológica de 37°C este efeito é revertido. Estes resultados sugerem assim que a baixas temperaturas (26-30°C) a proteína mutada consegue chegar até ao complexo de Golgi onde adquire a sua forma madura e prosseguir para a superfície celular, de onde é internalizada caso ocorra um aumento da temperatura¹⁷. Ainda assim, o transporte de Cl⁻ conduzido pela CFTR-F508del resgatada para a MP a baixa temperatura é muito deficiente, comparativamente com a CFTR não mutada (*wild type*, *wt*), e o canal resgatado apresenta ainda um tempo de vida na superfície das células muito reduzido, sendo rapidamente endocitada^{18,19}.

Deste modo, grande parte da investigação em FQ nas últimas décadas incidiu em estudar os mecanismos da doença e encontrar compostos que interagissem com a proteína CFTR-F508del ou com outras na sua via biosintética, com o objetivo de aumentar a eficiência do seu processamento e tráfego para a membrana bem como de potenciar a sua atividade de transporte de Cl⁻^{13,20,21}.

1.1.5 Corretores e Potenciadores

Nos últimos anos, um dos grandes desafios nesta área tem sido descobrir novos compostos capazes de corrigir o *folding* e transporte das proteínas com mutações de classe II, aos quais se deu o nome de “corretores”²².

Em 2011 foi descoberto por Van Goor *et al.*²³ um dos compostos mais promissores – o VX-809 – ao revelar uma grande eficácia na estimulação do processamento da banda B da CFTR-F508del a banda C. *In vitro*, o tratamento com o VX-809 possibilita que parte da

proteína com a mutação F508del consiga uma conformação mais estável que lhe permite sair do RE sem ser reconhecida como “defeituosa” assim como prosseguir o seu processo de maturação e chegar até à superfície das células. Além disso verificou-se ainda que a proteína corrigida pelo VX-809 era mais resistente a processos de proteólise²³.

Dados os bons resultados obtidos, o VX-809 seguiu para ensaios clínicos de modo a avaliar a sua segurança e eficácia no tratamento de doentes homozigóticos com a mutação F508del. No entanto, em ensaios da fase IIa, o tratamento com VX-809 não mostrou alterações significativas para a função pulmonar nem se verificou aumento da CFTR-F508del madura nas biopsias retais realizadas. Ainda assim, o estudo mostrou que a administração de VX-809 é segura e foram registadas melhorias ao nível das glândulas sudoríparas, tendo-se observado uma diminuição da concentração de Cl⁻ no suor²⁴.

Deste modo, e uma vez que a mutação F508del não possui um único defeito funcional, a estratégia terapêutica seguinte consistiu em desenvolver uma terapia combinada com um composto que aumentasse a eficácia do VX-809²⁵. Assim, foi alvo de ensaios clínicos a terapia combinada do corretor VX-809 com um potenciador, cujo mecanismo de ação aumenta a função do canal CFTR, o VX-770, que apresentou anteriormente excelentes resultados na recuperação da CFTR com mutações de classe III²⁵. Esta terapia combinada mostrou efeitos significativos nas concentrações de Cl⁻ no suor e na função pulmonar assim como a diminuição de exacerbações pulmonares em doentes homozigóticos para a F508del em ensaios de fase III^{26,27}, tendo sido aprovada nos Estados Unidos da América, Europa e Austrália inicialmente para doentes com mais de 12 anos²⁸. Recentemente, a administração do fármaco combinado foi também aprovada para crianças entre os 6 e 11 anos de idade e atualmente estão a decorrer ensaios clínicos de fase III para testar a viabilidade deste tratamento em crianças dos 2 aos 5 anos²⁹.

1.1.6 Estabilidade na Membrana Plasmática

Várias hipóteses têm sido levantadas para os efeitos modestos da terapia combinada com VX-809/VX-770⁶. Uma das mais robustas baseia-se no facto de, apesar dos bons resultados observados *in vitro* em células epiteliais brônquicas de doentes com FQ, o tratamento com VX-809 resultar numa menor estabilidade do canal na membrana em comparação com a recuperação da CFTR a baixas temperaturas ($t_{1/2} \approx 4,5$ h vs. 6 h)^{19,30}, ambos muito abaixo dos valores para a CFTR selvagem ($t_{1/2} \approx 14$ h)³⁰. Deste modo, apesar do mecanismo de ação do VX-809 no canal ainda não ter sido completamente elucidado, têm sido realizados diversos estudos nos últimos anos com o objetivo de aumentar a estabilidade da CFTR-F508del resgatada farmacologicamente com este composto.

Num desses estudos, publicado em Farinha *et al.*³¹ foi descoberto um efeito sinérgico perante o tratamento com VX-809 a baixas temperaturas (26°C) ao observar um aumento de cerca de 40% do canal mutado na membrana comparativamente ao resgate de ~15% obtido anteriormente apenas a baixas temperaturas, sugerindo que o composto VX-809 atua de maneira complementar ao efeito da baixa temperatura³¹.

Existem ainda evidências que a estabilidade do canal CFTR na superfície das células pode estar associada à ancoragem ao citoesqueleto de actina através da formação de um complexo macromolecular CFTR-NHERF1-Ezrina, prevenindo assim a sua endocitose. Resumidamente, a extremidade C-terminal da CFTR interage com os domínios PDZ da

proteína adaptadora NHERF1 (*Na⁺/H⁺-exchanger regulatory factor isoform-1*). Por sua vez, a extremidade livre C-terminal da NHERF1 liga-se à proteína Ezrina que posteriormente se liga aos filamentos de actina, promovendo assim a estabilização do canal na MP³²⁻³⁴.

Também várias proteínas da superfamília das Ras GTPases têm sido relacionadas à estabilidade do canal na membrana, nomeadamente as Rab e Rho GTPases, que estão descritas como reguladoras do transporte de proteínas através da via secretora e dos processos associados ao citoesqueleto de actina, respetivamente³⁵⁻³⁸. Estas proteínas funcionam como um *switch* molecular variando entre uma forma inativa, quando estão ligadas a guanosina difosfato (GDP), e uma forma ativa, ligada a guanosina trifosfato (GTP), sob a qual têm a capacidade de transmitir o sinal a jusante às proteínas das múltiplas vias de sinalização em que estão envolvidas³⁹. Recentemente, o laboratório de acolhimento mostrou que a Rho GTPase RAC1 está envolvida na estabilidade da CFTR na membrana e na ancoragem ao citoesqueleto de actina, ao induzir a síntese de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2) que ativa a Ezrina e consequentemente promove a formação do complexo CFTR-NHERF1-Ezrina e ancoragem deste aos filamentos de actina⁴⁰. Neste estudo, observou-se ainda que o HGF (hepatocyte growth factor) aumentava a ancoragem e estabilidade da CFTR na MP ao induzir a ativação da sinalização da Rac1 endógena (Figura 1.4) em células epiteliais brônquicas e que, quando administrado em conjunto com corretores químicos como o VX-809, permite potenciar até 3-vezes a ação destes, permitindo restaurar a função da CFTR-F508del para níveis próximos dos 25% da função do canal não mutado⁴⁰.

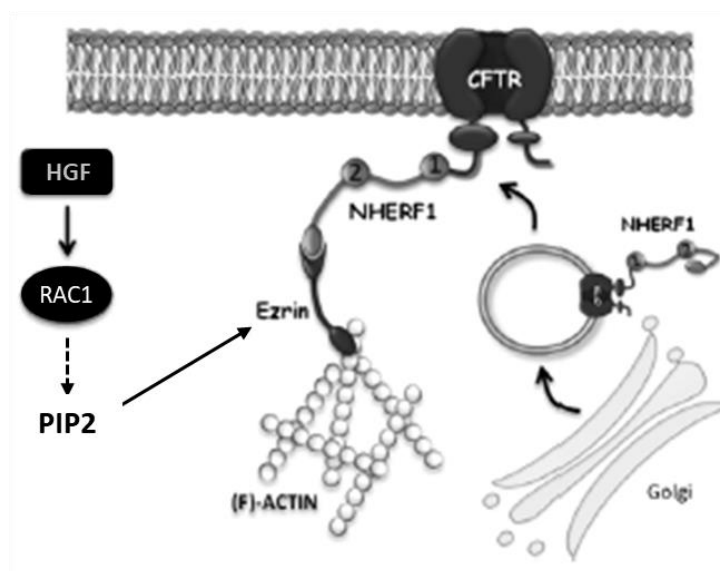


Figura 1.4 - Estabilização da CFTR na MP via RAC1 e HGF. A presença de PIP2, cuja síntese é induzida indiretamente pela RAC1 e pelo HGF, leva à ativação da proteína Ezrina e, consequentemente, à formação do complexo CFTR-NHERF1-Ezrina e ancoragem deste ao citoesqueleto de actina, promovendo assim a estabilização da CFTR na MP. Adaptado de ⁴¹.

No entanto, a administração prolongada de HGF, necessário para os regimes terapêuticos crónicos dos doentes com FQ, não seria seguro pois poderia levar a efeitos adversos, geralmente associados com a ativação permanente da sinalização de RAC1, como a estimulação da proliferação celular³⁵ e a progressão tumoral⁴². De facto, a RAC1

tem sido também alvo de diversos estudos na área do cancro e, em 1999, foi caracterizada por Jordan *et al.*⁴³ uma variante de *splicing* desta proteína, a RAC1b, sobreexpressa em cancro colorectal⁴³. A RAC1b resulta da adição de 57 nucleótidos à sequência codificante da proteína e consequente acréscimo de 19 resíduos de aminoácidos na sequência polipeptídica, situados no final da região regulatória *Switch II*⁴³. Recentemente, Matos *et al.*^{44,45} descreveu que a sobreexpressão desta variante de *splicing* em tumores colorectais é desencadeada em cenários de inflamação persistente e que esta atua interferindo com a função normal de RAC1, reencaminhando a sua sinalização predominantemente para vias pro-proliferativas e de sobrevivência celular⁴⁴. No entanto, a sua relação com a FQ, também caracterizada por processos inflamatórios severos ao nível pulmonar, não é ainda conhecida.

1.2 Ezrina

A proteína Ezrina pertence à família das proteínas ERM (Ezrina/Radixina/Moesina), uma classe de proteínas associadas com a ligação de proteínas da MP aos filamentos de actina do citoesqueleto. Pertence ainda à superfamília da proteína 4.1, com a qual tem em comum um domínio com cerca de 300 resíduos de aminoácidos em comum ao qual se dá o nome de FERM (*Four-point-one, Ezrin, Radixin, Moesin*). As proteínas ERM têm sido altamente conservadas ao longo da evolução e partilham entre elas cerca de 75% de homologia em toda a sua sequência peptídica⁴⁶⁻⁴⁸.

A Ezrina é constituída por 3 domínios principais: na extremidade N-terminal localiza-se o domínio globular FERM, o qual interage com as proteínas associadas à MP, que é ainda dividido em 3 subdomínios - FERM1, FERM2 e FERM3 -, o domínio α constituído por aproximadamente 177 resíduos de aminoácidos que formam uma estrutura de hélice α e a região C-terminal, composta por 89 resíduos de aminoácidos, sendo os últimos 34 resíduos responsáveis pela interação com os filamentos de actina do citoesqueleto (Figura 1.5)^{47,48}.

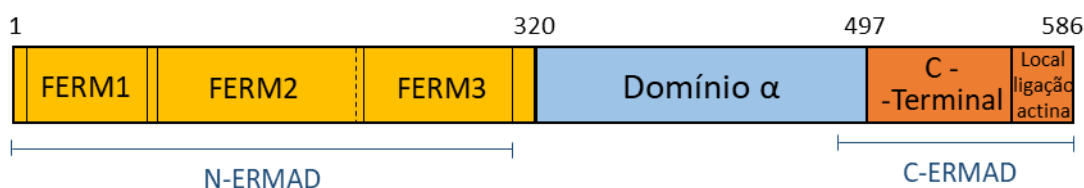


Figura 1.5 - Estrutura da Ezrina. A Ezrina tem um total de 586 aminoácidos e está dividida em 3 domínios: o domínio FERM (a amarelo, 320 aa), que é subdividido pelos subdomínios FERM1, FERM2 e FERM3, seguido do domínio α (a azul) e por fim o domínio C-terminal (a laranja, 89 aa) onde está inserido o local de ligação à actina de 34 resíduos de aminoácidos. Adaptado de ⁴⁸.

A função das proteínas ERM é regulada através de alterações conformacionais. Quando num estado inativo, a Ezrina adquire uma conformação “fechada” sobre si própria através de um mecanismo denominado interação *head-to-tail*. Esta conformação é conseguida através da interação da extremidade N-terminal com a extremidade C-terminal, também denominadas de N-ERMAD e C-ERMAD (*N- e C-terminal Ezrin-Radixin-Moesin Association Domain*), respetivamente, tornando assim inacessíveis os locais de ligação da Ezrina às proteínas de membrana e ao citoesqueleto de actina⁴⁹. A posterior ativação da

proteína é feita sequencialmente através da ligação de PIP2 ao domínio N-ERMAD, que leva à dissociação dos domínios C- e N-ERMAD, e da posterior fosforilação de uma Treonina conservada no domínio de ligação à actina (Treonina 567), que estabiliza a Ezrina no seu estado ativo⁵⁰. Quando num estado ativo, a ezrina pode ligar-se às proteínas associadas à membrana direta ou indiretamente (mediado por proteínas adaptadoras), sendo a estabilização da CFTR na MP e ancoragem ao citoesqueleto de actina um desses exemplos. Quando a Ezrina é ativada atinge a conformação necessária à ligação à NHERF1 e ao citoesqueleto de actina assim como induz a dissociação do domínio PDZ2 da proteína adaptadora NHERF1 do seu C-terminal, tornando também possível a ligação da CFTR ao domínio PDZ2^{34,48}, prevenindo assim a endocitose do canal (Figura 1.6)⁴¹.

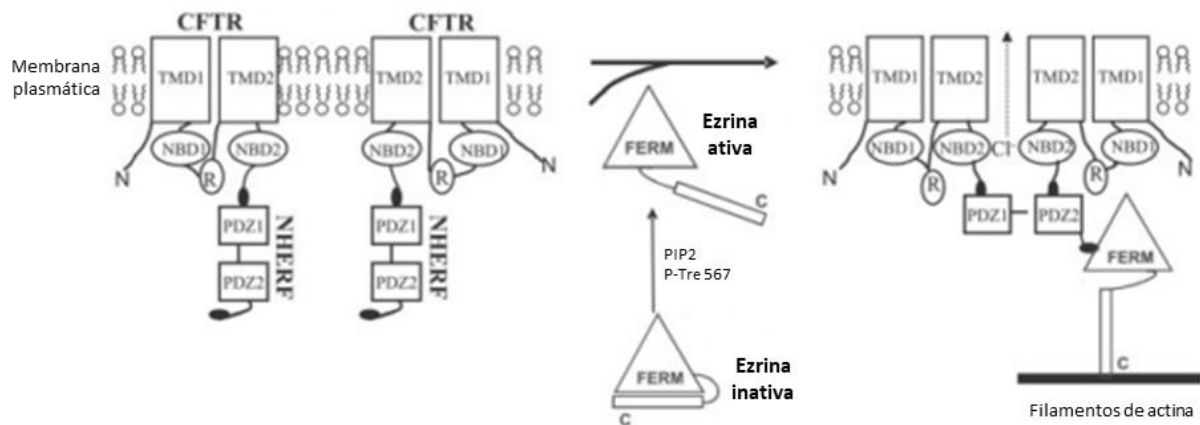


Figura 1.6 - Esquema do complexo macromolecular envolvido na estabilização da CFTR na membrana plasmática e ancoragem ao citoesqueleto de actina regulado pela Ezrina. Quando a Ezrina é ativada através da ligação de PIP2 e da fosforilação do resíduo de Treonina na posição 567, sofre uma alteração conformacional que torna acessível o local de ligação aos filamentos de actina (em C-terminal) e o domínio FERM que ligar-se-á à extremidade C-terminal da proteína adaptadora NHERF1. *In vitro*, a ativação da Ezrina induz uma alteração conformacional na NHERF1 possibilitando que ambos os domínios PDZ se liguem à proteína CFTR. Adaptado de ³⁴.

No entanto, o grupo de acolhimento mostrou recentemente, e com base em estudos de influxo de iodeto, que a ligação da CFTR-F508del corrigida farmacologicamente à proteína Ezrina deletada no seu domínio C-terminal (Ezrina Δ Ct) aumentava até 6 vezes o efeito do VX-809 na atividade do canal. Neste sentido, concluiu-se que a ancoragem ao citoesqueleto de actina não é essencial na estabilização da CFTR-F508del corrigida com o VX-809 na superfície celular - o domínio C-terminal deletado da Ezrina Δ Ct é o domínio responsável pela interação com os filamentos de actina. Estas observações sugerem que apenas o domínio FERM da Ezrina seja necessário (e suficiente) para reter a CFTR-F508del resgatada farmacologicamente na PM, através da formação do complexo macromolecular CFTR-NHERF1-Ezrina(FERM)⁴¹.

1.3 Domínio de transdução da proteína Tat (TAT)

A proteína Tat, do inglês “*Trans-activator of transcription*”, é uma proteína reguladora da transcrição do vírus do HIV-1 (*Human Immunodeficiency Virus 1*) constituída por 86 aminoácidos. Em 1988, dois estudos independentes mostraram que esta proteína era capaz de atravessar as membranas celulares quando adicionada ao meio de cultura de linhas celulares e dirigir-se até ao núcleo onde atua no promotor do HIV-1 ativando a transcrição^{51,52}, podendo ligar-se a mais de 10^7 locais por célula alvo e sendo ativa em vários tipos celulares⁵³.

Apesar de o mecanismo pelo qual a Tat consegue atravessar as membranas celulares ainda não estar completamente elucidado pensa-se que este se baseia numa interação entre os aminoácidos básicos da proteína (resíduos 49-57) e os lípidos carregados negativamente da MP, tal como acontece com outros domínios de transdução de proteínas^{53,54}.

Esta capacidade da proteína Tat mostrou-se assim revelante do ponto de vista terapêutico como transportadora de proteínas e péptidos recombinantes, bem como de outros compostos macromoleculares para as células⁵⁵. Deste modo, e com vista à construção de proteínas de fusão com a proteína Tat, foi importante perceber qual a região da proteína essencial para a transdução de modo a reduzir o tamanho da sequência a utilizar⁵⁶. O domínio de transdução da Tat (TAT) foi então definido pela seguinte sequência de 11 aminoácidos (resíduos 47 a 57): Tirosina-Glicina-Arginina-Lisina-Lisina-Arginina-Arginina-Glutamina-Arginina-Arginina-Arginina (YGRKKRRQRRR)^{52,56}, entre os quais consta uma sequência (GRKKR) usada como sinal para o transporte nuclear da proteína Tat nativa⁵⁷.

Diversas estratégias terapêuticas promissoras tem sido desenvolvidas com base na entrega de proteínas de fusão TAT⁵⁸⁻⁶⁰. Entre estas encontra-se uma aplicada na terapêutica do próprio HIV-1, que utiliza a transdução de uma protease pró-apoptótica (a caspase-3) modificada para ser ativada pela protease do vírus, o que leva especificamente à apoptose das células infetadas⁶¹ *in vitro*, mas também *in vivo*, em murganhos, onde foi também possível demonstrar a transdução sistémica de proteína de fusão TAT em vários tecidos, inclusive no cérebro⁶². Estes resultados reforçam assim a hipótese da aplicação terapêutica na transdução de pequenos péptidos ou proteínas bioativas em patologias afetando múltiplos órgãos ou sistemas.

1.4 Objetivos

Estudos recentes mostraram que a estabilização na MP da CFTR-F508del, corrigida com o corretor VX-809, na MP é conseguida após a ativação da proteína Ezrina e da interação do seu domínio FERM com a proteína adaptadora NHERF1, fortalecendo a ligação desta última à CFTR. Neste sentido, o principal objetivo do presente trabalho foi confirmar e perceber qual o papel do domínio FERM da Ezrina na estabilização da CFTR-F508del corrigida farmacologicamente na superfície celular. Para tal, foram seguidas as seguintes etapas:

- Transfetar células respiratórias humanas com construções de fusão da proteína fluorescente CFP (*cyan fluorescent protein*) com os vários subdomínios FERM (1-3) da proteína Ezrina;
- Determinar qual(ais) deste(s) subdomínio(s) da proteína Ezrina que é(são) responsável(eis) pela potenciação da recuperação funcional de F508del-CFTR;
- Gerar novas construções de fusão entre o(s) subdomínio(s) relevante(s) caracterizado(s) no ponto anterior e o domínio TAT de transdução proteica do HIV-1;
- Produzir os péptidos de fusão construídos no ponto anterior e utilizá-los para determinar o seu potencial para reter a CFTR-F508del resgatada farmacologicamente na MP, em ensaios funcionais em células epiteliais brônquicas.

Como visto anteriormente, a proteína adaptadora NHERF1 apresenta uma conformação semifechada através da interação do seu domínio PDZ2 e a região EBD C-terminal, deixando disponível apenas o domínio PDZ1 para se ligar à CFTR. Quando a Ezrina é ativada, leva à alteração conformacional da NHERF1 através da ligação ao domínio C-terminal desta última, tornando assim acessível o domínio PDZ2 do NHERF1 para ligação à CFTR, o que fortalece a sua estabilidade na MP. Deste modo, um outro objetivo deste trabalho foi explorar este mecanismo para desenvolver um sensor de FRET capaz de detetar condições que promovam esta alteração conformacional da proteína NHERF1 em futuros ensaios de alto rendimento.

Finalmente, um último objetivo deste trabalho de mestrado consistiu no estudo dos níveis de expressão da variante de *splicing* RAC1b, em tecidos epiteliais brônquicos de doentes com FQ, homozigóticos para a mutação F508del e sua correlação com o processo inflamatório associado à doença.

2. Materiais e Métodos

2.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A técnica de PCR é usada para amplificar fragmentos de DNA específicos de uma amostra com recurso a pares de oligonucleótidos iniciadores (*primers*), desoxirribonucleótidos tri-fosfatados (dNTP's) e a um enzima DNA polimerase termoestável. Esta técnica é realizada num termociclador percorrendo várias etapas: desnaturação, hibridação (*annealing*) e extensão⁶³.

A primeira etapa tem como objetivo a desnaturação da cadeia dupla de DNA de modo a tornar disponíveis cada uma das cadeias simples da molécula à reação de PCR, sendo realizada a 94°C. A etapa de *annealing* consiste na hibridação de *primers*, isto é, sequências de oligonucleótidos desenhados estrategicamente de forma complementar à sequência a amplificar, nas extremidades 5' das cadeias simples de DNA, sendo a temperatura desta etapa dependente da sequência de nucleótidos a hibridar. Por último, na fase de extensão, que se dá a uma temperatura de 72°C, são sucessivamente adicionados os nucleótidos complementares à sequência alvo com recurso à DNA polimerase. Este procedimento é repetido entre 25 a 40 ciclos de modo a produzir várias cópias do fragmento de DNA pretendido – o amplicão⁶³.

As misturas de reação de PCR foram preparadas com 0,2 µM de cada um dos *primers* a utilizar e 0,5 U de DNA polimerase *Dream Taq* (Thermo Fisher Scientific) num volume final de 25 µl em Tampão de PCR (50 mM KCL, 10 mM Tris-HCl pH 9, 1,5 mM MgCl₂, 0,1% de Gelatina (DifcoLab) e 0,2 mM de cada dNTP). Estas misturas de reação foram preparadas numa sala própria para o efeito a fim de evitar contaminações de DNA das soluções stock. As amostras de DNA foram adicionadas posteriormente numa quantidade variável entre 2-5 µl, conforme o objetivo da técnica de PCR. Os pares de primers utilizados neste trabalho, assim como as respetivas temperaturas de *annealing* e número de ciclos realizados nas respetivas reações de PCR encontram-se no anexo 6.1 (Tabela 6.1, Tabela 6.2 e Tabela 6.3).

2.1.1 Análise da expressão de RAC1b e CK8 em tecidos homozigóticos CFTR-F508del

Com o objetivo de estudar a expressão de RAC1b e CK8 em amostras de cDNA obtidas a partir de tecidos do epitélio brônquico de doentes de FQ homozigóticos para a mutação F508del, recorreu-se à técnica de PCR.

Para cada amostra fez-se a mistura de reação com tampão de PCR, DNA polimerase (*Dream Taq*) e cDNA (correspondente a ~100 ng de RNA) para os dois PCR, que posteriormente foi dividida e à qual se adicionou os respetivos *primers* (Tabela 6.1). Ambos os PCR foram realizados no termociclador Tpersonal (Biometra) e começaram com uma desnaturação inicial a 94°C durante 10 segundos. As 3 etapas posteriores de desnaturação, *annealing* e extensão tiveram a duração de 30 segundos cada, sendo que se repetiram

durante 33 ciclos para o RAC1/RAC1b e 30 ciclos para a CK8. A etapa final de extensão a 72°C teve a duração de 10 minutos.

2.1.2 Eletroforese em géis de agarose

Para analisar e separar fragmentos de DNA foi recorrentemente utilizada a eletroforese em géis de agarose. Esta eletroforese é feita horizontalmente em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE, 89 mM Tris, 89 mM Ácido Bórico e 2 mM EDTA) e a voltagem constante (geralmente entre 70 a 95 Volts (V)).

A percentagem de agarose utilizada no gel depende do tamanho dos fragmentos a separar, sendo que o aumento da percentagem de agarose origina poros sucessivamente mais pequenos. Conforme o tamanho dos fragmentos é então escolhida a percentagem de agarose adequada (geralmente entre 0,5 a 2% (p/v)) que será dissolvida em TBE. A essa mistura é ainda adicionado Brometo de Etídeo, que irá intercalar-se na estrutura do DNA, permitindo a visualização das bandas no gel ao emitir fluorescência num comprimento de onda à volta dos 605 nm (laranja) quando exposto à luz ultravioleta⁶³.

Às amostras a aplicar no gel foi adicionado um *loading buffer*, contendo glicerol para aumentar a densidade da amostra e facilitar a aplicação, e um corante (geralmente azul de bromofenol, orange G ou xileno cianol) que permite monitorizar a corrida das amostras. Foi ainda aplicado um marcador com fragmentos de DNA de tamanhos conhecidos num dos poços do gel para ajudar a estimar o tamanho dos fragmentos de DNA nas amostras. No final da corrida, os géis foram colocados num transiluminador de luz UV e fotografados recorrendo ao sistema de aquisição digital de imagens *FireReader*TM.

2.2 Clonagem

A clonagem é uma ferramenta que permite a manipulação de moléculas de DNA com fim a criar novas moléculas de DNA recombinante. Esta manipulação genética faz uso de enzimas endonucleases de restrição que reconhecem sequências de nucleótidos específicas (geralmente de 4 a 6 pb) hidrolisando-as nessa região do DNA, na presença de um tampão adequado. O fragmento resultante da hidrólise é posteriormente ligado, com recurso a um DNA ligase, a um plasmídeo também hidrolisado previamente com os mesmos enzimas de restrição (geralmente numa região denominada por *multiple cloning site* (MCS)), de modo a ter as extremidades complementares com o fragmento a ser clonado⁶³.

A clonagem de fragmentos de DNA em plasmídeos, preparados para atuar como vectores de expressão génica em células de mamífero, alia duas grandes vantagens: 1) serem facilmente produzidos, por incorporação (transformação) e amplificação em bactérias competentes (geralmente estirpes laboratoriais de *Escherichia coli* (*E. coli*)); 2) poderem ser transfetados em células eucarióticas (ver 2.3.1), induzindo a expressão de altos níveis de proteína recombinante por meio de promotores virais otimizados⁶³.

Neste trabalho procedeu-se à subclonagem da construção de fusão TAT-FERM2 (sintetizado pela NZYTech e incorporado no plasmídeo pNZY29 para produção de proteínas recombinantes em *E. coli*) no vector pcDNATM3.1/Hygro (pcDNA3-hygro, Invitrogen),

originando o vector pcDNA3-hygro-TAT-FERM2. Este vector possui na sua estrutura de base uma cassette de resistência a Higromicina B que permitirá a seleção de linhas celulares a expressarem estavelmente o péptido recombinante TAT-FERM2.

A digestão do vector original pcDNA3-hygro e do vector com o *insert* (TAT-FERM2) foi feita com os enzimas de restrição Hind III (Invitrogen) e Xba I (Invitrogen) em tampão 2 (New England Biolabs) e na presença de 0,1 mg/ml de BSA (New England Biolabs) durante 1h e 30 minutos a 37°C. A digestão foi confirmada por corrida de ¼ do volume de reação em eletroforese em gel de agarose de 1%. Posteriormente a digestão que continha o *insert* foi novamente aplicada, na sua totalidade, em gel de agarose e o *insert* foi extraído do gel e purificado com o *GeneJet Gel Extraction Kit* (Thermo Fisher Scientific). O vector foi ainda desfosforilado com 1U de fosfatase alcalina (*Rapid DNA Dephos & Ligation Kit*, Roche) durante 1h a 65°C e posteriormente também purificado com o *kit NucleoSpin® Gel and PCR clean up* (Macherey-Nagel). De seguida, a ligação do vector e do *insert* foi feita na proporção de 1:7 (v/v) com o *Rapid DNA Dephos & Ligation Kit* (Roche), baseado na ação do DNA ligase do bacteriófago T4. A utilização de todos os *Kits* decorreu de acordo com as instruções do fabricante.

Posteriormente, as transformações dos plasmídeos recombinantes foram feitas em bactérias competentes *E. coli* DH5α na proporção de 1:5 (v/v) e incubadas em gelo durante 30 minutos. Findo esse tempo, as bactérias foram sujeitas a um choque térmico a 42°C durante 30-45 segundos para que sejam abertos poros nas membranas das mesmas permitindo a entrada do DNA exógeno, e colocadas de imediato novamente em gelo durante pelo menos 2 minutos, de modo a recuperarem e para que os poros na membrana se fechem. Todo o procedimento posterior foi efetuado à chama para garantir a esterilidade, e começou por se adicionar uma quantidade de Meio Luria-Bertani (LB) líquido (previamente colocado à temperatura ambiente) 5 vezes superior ao volume de bactérias. A mistura foi colocada durante pelo menos 1 hora a 37°C e sob agitação constante a 400 rpm. Em seguida a transformação foi plaqueada na totalidade em placas de LB-Agar com 100 µg/ml de Ampicilina (Sigma-Aldrich) que foram colocadas numa estufa a 37°C durante a noite (*overnight* – O/N). Deste modo, as bactérias que incorporaram o DNA exógeno irão crescer e formar colónias na placa pois o plasmídeo pcDNA3-hygro contem também uma cassette de resistência ao antibiótico Ampicilina.

Para garantir que determinada colónia incorporou o plasmídeo correto, ou seja, o que tem o *insert* pretendido e não só o plasmídeo religado, foi feito um PCR com *primers* que hibridam no plasmídeo em regiões que flanqueiam o *insert* (neste caso utilizaram-se os *primers* PCMV5-1F e PFGH-R1 – Tabela 6.3) – procedimento chamado de *screening*. A avaliação da integridade da clonagem é feita através do tamanho do amplicão pretendido e da comparação com o amplicão proveniente do plasmídeo sem *insert*, incluído no ensaio como controlo. Posteriormente, as colonias positivas, isto é, que produzem o plasmídeo desejado, foram colocadas a crescer em 3ml de LB líquido suplementado com Ampicilina num agitador orbital (GallenKamp) a 37°C sob agitação constante de 220 rpm e O/N.

No dia seguinte o DNA plasmídico foi extraído das bactérias e purificado com o *kit GeneJet Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Fisher Scientific), obtendo-se uma “mini-prep”. Finalmente a mini-prep obtida foi quantificada no espectrofotómetro *Nano-Vue* (MacCHESS) onde se mediu a sua concentração de DNA através da leitura da Absorvância a 260 nm (A260nm) (Absorvância=ε·c·l, onde ε é o coeficiente de absorvidade molar, especifica para

o comprimento de onda usado, e l a distancia percorrida pelo feixe de luz) e o seu grau de pureza através da razão A280nm/A260nm, que deve ser aproximadamente 1,8⁶³.

As restantes subclonagens efetuadas neste trabalho tiveram como objetivo a troca de um determinado fragmento de DNA entre vectores ou a substituição de determinada sequência de DNA de um vector envolvendo assim um passo prévio de subclonagem adicional que está descrita abaixo (ponto 2.2.1).

2.2.1 Subclonagem no vector TOPO

Quando se pretende fazer uma clonagem a partir de um produto de PCR, é recorrente efetuar-se um passo intermédio que consiste em clonar primeiramente a sequência de DNA obtida por PCR num vector para amplificação em bactérias, como o vector pCR™2.1-TOPO® (Invitrogen) parte de um kit (TOPO® TA Cloning® Kit – Invitrogen) desenhado para facilitar este processo. Este passo intermédio permite garantir a clonagem inicial do produto de PCR e perceber se foi amplificado o produto de PCR pretendido, através de sequenciação, antes de prosseguir para a clonagem final. Como os *primers* utilizados (Tabela 6.2) na amplificação dos fragmentos desejados foram desenhados para incluir a 5' sequências de reconhecimento para endonucleases específicas, para possibilitar a inserção nos plasmídeos alvo, o facto de os produtos estarem inseridos num vector, garante ainda a presença de um número suficiente de nucleótidos a flanquear estas sequências para que os endonucleases atuem de forma correta e eficiente. A utilização do *kit* TOPO® TA Cloning®, seguiu as indicações do fabricante.

Esta estratégia foi utilizada na substituição do FERM2 no pcDNA3-hygro-TAT-FERM2 pelo CFP. Esta clonagem teve como objetivo construir um péptido de fusão TAT controlo. O CFP (*Cyan Fluorescent Protein*) foi amplificado por PCR a partir do vector pECFP-C3 (Clontech). Um quinto do produto de PCR (5 µl) foi corrido em gel de agarose 1% para confirmar que foi amplificado o produto esperado e posteriormente clonado no vector TOPO. Após a confirmação, através de sequenciação, que a sequência inserida estava conforme pretendido seguiu-se para a clonagem final.

Deste modo, ambos os vectores TOPO-CFP e pcDNA3-hygro-TAT-FERM2 foram digeridos com os enzimas de restrição Xho I (Invitrogen) e Sma I (Thermo Fisher Scientific) na presença de tampão 4 (New England Biolabs) e BSA durante 1h e 30 minutos a 37°C. A eficiência da digestão foi avaliada em gel de 1% agarose e o vector digerido foi desfosforilado como descrito anteriormente. Após confirmada a digestão, a quantidade restante de ambas as digestões foram separadas em gel de 1% agarose e o *insert* CFP e o vector pcDNA3-hygro-TAT foram extraídos do gel e purificados como anteriormente. O restante procedimento de ligação, transformação, *screening* e crescimento em cultura foi feito tal como descrito em 2.2.

2.2.2 Sequenciação

Em biologia molecular é importante perceber a integridade e a sequência de um dado plasmídeo ou de um produto de clonagem, determinando-se a respetiva sequência de nucleótidos. A sequenciação foi feita com base no método de Sanger, em que após a hibridação do *primer* na cadeia simples do DNA alvo, são adicionados em 3', de forma complementar à sequência de DNA, desoxirribonucleótidos ou didesoxirribonucleóticos (que não possuem o grupo OH necessário à formação da ligação fosfodiéster com o nucleótido seguinte - terminadores) – por um DNA polimerase. Assim, quando adicionados didesoxirribonucleóticos, a ausência do grupo OH resulta na terminação prematura da sequência complementar em síntese, existindo no final da reação múltiplas sequências prematuras de tamanhos variáveis. Na abordagem de sequenciação utilizada neste trabalho, os oligonucleótidos terminadores encontram-se covalentemente ligados a fluoróforos, sendo que a cada base azotada corresponde um fluoróforo diferente. No final, a reação de sequenciação é aplicada num capilar de eletroforese de um sequenciador automático (3130xl Genetic Analyser, Applied Biosystems) onde os fluoróforos são excitados por um laser emitindo luz nos seus comprimentos de onda específicos sendo permitido deduzir a sequência original com base no tamanho dos fragmentos e na fluorescência do respetivo nucleótido terminador incorporado.⁶³

A reação de sequenciação começou com uma desnaturação a 96°C durante 10 minutos seguida de 25 ciclos com 10 segundos de desnaturação, 5 segundos de *annealing* e 4 minutos de extensão a 60°C, permitindo assim a amplificação linear da cadeia simples de DNA. As reações foram feitas num volume total de 10 µl onde se adicionou 1 µl de DNA polimerase *BigDye™* em tampão próprio, 20 µmol do *primer* a utilizar (Tabela 6.4) e 350 ng de DNA.

As sequenciações foram posteriormente avaliadas com recurso à ferramenta bioinformática *BLAST®* (*Basic Local Alignment Search Tool*, NCBI, (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), onde foram comparadas com a sequência de DNA esperada. Desvios à sequência esperada foram confirmados diretamente por leitura dos electroferogramas produzidos pelo *software* do sequenciador automático.

2.3 Cultura de células

A cultura de células é uma técnica com grande aplicação nas áreas da biologia celular que consiste na cultura e manutenção de células isoladas de um tecido animal em condições favoráveis específicas. Deste modo, é importante garantir um meio de cultura adequado – meio simples ou suplementado com um soro animal – tendo em conta a sua composição em nutrientes, vitaminas, cofatores, fatores de crescimento e proteínas, pH e osmolaridade, assim como as condições físicas de incubação no que respeita à temperatura e percentagem de dióxido de carbono (CO₂) – sendo normalmente usada uma estufa de atmosfera humidificada a 37°C com 5% de CO₂^{64,65}.

Um outro requisito importante na manutenção de linhas celulares é garantir condições assépticas com o objetivo de prevenir possíveis contaminações. Assim, os meios de cultura e materiais devem estar estéreis e devem ser usadas câmaras de fluxo laminar,

devidamente descontaminadas através de radiação ultravioleta, na manipulação das linhas celulares. Todos os materiais não estéreis e superfícies de trabalho devem ainda ser desinfetados com álcool a 70%⁶⁴.

A proliferação das células em cultura pode dar-se em monocamada ou em suspensão, conforme o tipo celular (aderente ou não aderente), e é feita em placas ou em frascos de cultura conforme o número de células necessário. Quando as células atingem uma confluência ótica entre 80-100% é feita uma diluição e subcultura (ou “passagem”) das mesmas para um ou mais novos frascos de cultura. No caso das linhas celulares em monocamada, as interações célula-célula e célula-frasco de cultura são quebradas através da adição de tripsina, e posteriormente, as células já em suspensão são diluídas em meio de cultura e uma fração da diluição, dependente do crescimento verificado, é transferida para um novo frasco com meio de cultura novo.

No entanto, as linhas celulares não podem ser mantidas em cultura por tempo ilimitado. Com o aumento do número de passagens estas podem sofrer alterações genéticas que poderão gerar fenótipos aberrantes e desvirtuar os resultados dos trabalhos experimentais pelo que não é recomendável manter-se uma determinada linhagem celular em cultura por mais do que 30 passagens. Deste modo, é fundamental armazenar alíquotas das linhas celulares aquando das primeiras passagens de forma a ter sempre disponível uma determinada linha celular perto do seu estado inicial.

O armazenamento de células é feito através da criopreservação que consiste no congelamento das alíquotas de células em azoto líquido (-196°C). As alíquotas são feitas após a passagem das células em que a diluição restante é centrifugada a 300 x g durante 5 minutos. O *pellet* de células resultante é ressuscitado numa mistura de FBS e 10% de DMSO - um agente crioprotetor - e são feitas alíquotas de 1 ml em ampolas próprias para criopreservação que são armazenadas primeiramente a -80°C num recipiente com isopropanol, e após um mínimo de 24 horas, transferidas para contentores com azoto líquido. O DMSO e o primeiro armazenamento a -80°C em isopropanol tem como intuito um congelamento progressivo evitando assim a formação de cristais de gelo que poderiam disromper as membranas celulares levando à lise celular ⁶⁴. O descongelamento das alíquotas criopreservadas deve ser feito o mais rapidamente possível colocando as ampolas a 37°C e assim que descongeladas a mistura deve ser transferida para o frasco de cultura com o meio de cultura apropriado. No entanto, na maioria das linhas celulares é aconselhada a remoção do DMSO, que é tóxico para as células, através da centrifugação do conteúdo da ampola. Após a centrifugação, as células são então ressuscitadas no respetivo meio e transferidas para o frasco de cultura.

Nos estudos realizados neste trabalho experimental foram utilizadas linhas celulares derivadas de células do epitélio brônquico de um doente com FQ (*Cystic Fibrosis Bronchial Epithelial cells* - CFBE), sem expressão detetável de CFTR, que foram modificadas para expressarem estavelmente os cDNAs da CFTR *selvagem* (wt) ou F508del humanas – CFBE wt e CFBE F508del, respetivamente. Foi ainda utilizada uma linha derivada das células CFBE F508del, a qual foi modificada para expressar também estavelmente um mutante da proteína fluorescente YFP (YFP-F46L/H148Q/I152L ou HS-YFP) sensível a variações na concentração intracelular de iodeto, usadas nos ensaios de influxo de iodeto (ver 2.6). Também foram usadas linhas celulares derivadas de rim de hamster (*Baby Hamster Kidney cells* – BHK) e de células embrionárias de rim humanas (*Human Embryonic Kidney 293 cells* - HEK-293). As linhas celulares CFBE foram mantidas em cultura em Meio Mínimo Essencial

(MEM+GlutaMAX™, Gibco™, ThermoFisher Scientific) suplementado com 10% (v/v) de Soro Fetal Bovino (FBS, Gibco™, ThermoFisher Scientific) e Puromicina (2 µg/ml, Gibco™, ThermoFisher Scientific). As células HEK 293 foram mantidas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM+GlutaMAX™, Gibco™, ThermoFisher Scientific) suplementado com 10% (v/v) de FBS e para as células BHK foi usado o Meio Eagle Modificado por Dulbecco com Mistura de Nutrientes F-12 (DMEM-F12+ GlutaMAX™, Gibco™, ThermoFisher Scientific) suplementado com 10% (v/v) de FBS. Para os clones estáveis de CFBE CFTR-F508del-HS-YFP(F46L/H148Q/I152L) foi acrescido 400 µg/µl de Higromicina B (Invitrogen) ao meio usado para as células CFBE F508del parentais. Para os clones de HEK-TAT-CFP/FERM2 foi acrescido 200 µg/ml de Higromicina B ao meio usado para as células HEK parentais.

As linhas celulares foram mantidas em cultura majoritariamente em frascos de cultura com 75cm² – T75 (VWR) e cultivadas em placas com 35 mm de diâmetro – p35 (Thermo Fisher Scientific) – ou 60 mm de diâmetro – p60 (Thermo Fisher Scientific) – para os diversos procedimentos experimentais, sendo os meios aquecidos previamente à sua utilização a 37°C. Aquando das passagens, após retirar o meio de cultura dos frascos, as células foram lavadas com 2 ml de Tripsina+0,05% EDTA (Gibco™, ThermoFisher Scientific) para retirar os vestígios de meio que ficaram no frasco e que iriam inibir o passo de tripsinização, e posteriormente foi adicionado 1 ml de tripsina e as células foram colocadas na estufa. Excepcionalmente, no caso das células CFBE iniciou-se este processo com uma lavagem com 2 ml de PBS (Gibco™, ThermoFisher Scientific) + 0,05% EGTA (Sigma-Aldrich) e posteriormente as células foram colocadas na estufa com 1 ml novo de PBS+0,05%EGTA. Este passo é importante para quebrar as interações célula-célula, sendo o EGTA um agente quelante, mais específico que o EDTA, para os iões Ca²⁺ necessários nas adesões celulares mediadas por caderinas, que no caso desta linha celular são muito fortes e dificultaria o processo de tripsinização, sendo este passo monitorizado ao microscópio ótico invertido. O PBS+EGTA foi então substituído por 1 ml de tripsina+EDTA e procedeu-se à passagem das células para o novo frasco de cultura, como descrito anteriormente.

As linhas celulares em cultura foram testadas mensalmente para a presença da bactéria *Mycoplasma* uma vez que esta é uma contaminação frequente em laboratórios de cultura celular. Esta contaminação não é perceptível ao microscópio nem provoca alterações físicas no meio de cultura mas afeta o crescimento celular e provoca alterações no metabolismo celular⁶³. Quando detetada a presença desta estirpe bacteriana, através de PCR, as células foram tratadas com o antibiótico Plasmocin™ (InvivoGen) que foi adicionado por 15 dias consecutivos ao respetivo meio de cultura numa concentração final de 25 µg/ml.

2.3.1 Transfeção celular

A transfeção celular consiste na introdução de DNA ou RNA exógenos nas células com o intuito de estudar a expressão e função de determinados genes ou proteínas específicas, assim como para produzir proteínas recombinantes. A transfeção pode ser transiente ou estável. No primeiro caso as células expressam o material genético introduzido durante um período de tempo limitado enquanto numa transfeção estável o material

genético introduzido nas células é incorporado no genoma das mesmas e expresso constitutivamente com o crescimento celular⁶⁶.

A transfeção poderá ser efetuada através de métodos biológicos – utilizando vírus para introduzir o material genético nas células (também designada por transdução) –, químicos – através do uso de polímeros ou de lípidos catiónicos –, ou físicos – com recurso a eletroporação, por exemplo. O método de transfeção química é o mais comum e tem como princípio a formação de complexos entre moléculas carregadas positivamente com o material genético que possui carga negativa, encapsulando assim o DNA. Os complexos formados são posteriormente adicionados às células, interagem com os lípidos carregados da MP e acredita-se que libertem o DNA dentro das células através de endocitose. Este método de transfeção apresenta uma baixa citotoxicidade, fácil aplicabilidade e disponibilidade como vantagens sendo que a eficiência de transfeção depende do tipo de células⁶⁶.

Com fim à transfeção celular as células foram inicialmente colocadas a crescer em placas p35 ou p60 com 2 ml ou 5 ml, respetivamente, do meio apropriado. Após cerca de 24h, tempo suficiente para que ocorra a adesão celular às placas, procedeu-se à transfeção. Neste trabalho usou-se como reagentes e meios de transfeção a LipofectaminaTM 2000 (LF2K, Invitrogen) e meio OptiMEM (GibcoTM, ThermoFisher Scientific) para células CFBE e BHK e Metafectene® (Met, Biontex) e meio DMEM simples para células HEK 293. O processo de transfeção começa com a formação de duas soluções independentes com o respetivo meio, uma com o reagente de transfeção e outra com o DNA, que ficam a repousar durante 5 minutos. De seguida as soluções são misturadas para que ocorra a formação dos complexos que, ao fim de 20 minutos, são adicionadas ao meio de cultura das células (condições na Tabela 2.1).

Tabela 2.1 - Condições de transfeção para cada linha celular.

Tipo celular	Nº de células	DNA	Reagente de transfeção	Formação dos complexos
BHK	2,6 x 10 ⁵ /p35	4 µg	8 µl LF2K	125 µl de OptiMEM + LF2K 125 µl de OptiMEM + DNA
CFBE	2 x 10 ⁶ /p35	3 µg	9 µl LF2K	125 µl de OptiMEM + LF2K 125 µl de OptiMEM + DNA
HEK 293	7,5 x 10 ⁵ /p35	1 - 5 µg	4,5 – 22,5 µl Met	150 µl de DMEM + Met 150 µl de DMEM + DNA
	2 x 10 ⁶ /p60	3 - 15 µg	13,5 – 67,5 µl Met	300 µl de DMEM + Met 300 µl de DMEM + DNA

2.3.2 Produção dos péptidos de fusão TAT

A produção dos péptidos de fusão TAT-CFP e TAT-FERM2 foi feita com recurso a linhas celulares, sendo estes secretados para o respetivo meio de cultura uma vez que incluem no início da sua sequência codificante (N-terminal) o péptido sinal da proteína prolactina (MNIKGSPWKGSLLLLLVSNLLLCQSVAP) que os encaminha para a via secretora.

Numa etapa inicial foi necessário testar qual a melhor linha celular para o efeito, tendo-se optado pelas células BHK e HEK 293 uma vez que são linhas celulares com uma alta eficiência de transfeção. As células foram assim transfectadas com o plasmídeo pcDNA3-hygro-TAT-FERM2 e com os plasmídeos pCDNA3-hygro-TAT-CFP e pECFP-C3 (CFP EV) como controlos.

As condições de transfeção estão resumidas na Tabela 2.1, sendo que foi transfectada uma quantidade de DNA 5 vezes superior de pcDNA3-hygro-TAT-FERM2 em relação aos controlos. Esta proporção no caso das células BHK F508del foi ajustada com a transfeção de um plasmídeo vazio, o pcDNA3-Myc-*Empty Vector*, para um total de 4 µg de DNA. Para as células HEK 293 é possível ajustar a quantidade de DNA com a quantidade de Metafectene, pelo que em placas p35 foi transfectado 1 µg de DNA de ambos os controlos com 4,5 µl de Metafectene e 5 µg de pcDNA3-hygro-TAT-FERM2 com 22,5 µl de Metafectene, sendo estas quantidades triplicadas quando foram usadas placas p60. Passadas 4h desde a transfeção, tempo necessário para que o DNA entre nas células, os meios de cultura foram renovados para metade do que é habitualmente usado, isto é, 1 ml no caso das p35 e 2,5 ml para as p60, com o objetivo de concentrar as proteína de fusão secretadas no meio.

Após pelo menos 24h foram recolhidas alíquotas dos meios de cultura a vários intervalos de tempo, conforme o estudo a realizar (ver 3.2.2), e quando recolhido todo o meio de cultura procedeu-se à lise das células. Os meios recolhidos foram centrifugados a 6000rpm durante 5 minutos, de modo a depositar os detritos celulares presentes no meio, e os sobrenadantes guardados a -20°C para posterior utilização.

2.3.3 Clones estáveis

Com recurso às transfeções estáveis é possível modificar uma linha celular de modo que passe a expressar constitutivamente determinado DNA exógeno introduzido, sendo as células selecionadas através de um marcador de seleção geralmente presente no mesmo vector que o DNA de interesse.

Neste trabalho criaram-se clones estáveis de células HEK 293 com o objetivo de expressarem constitutivamente e secretarem o péptido de fusão TAT-FERM2 e, como controlo, em paralelo, o péptido TAT-CFP. Os péptidos de fusão foram clonados no vector pcDNA3-hygro que tem como marcador de seleção o antibiótico Higromicina B.

Ambos os plasmídeos foram linearizados com o endonuclease Sspl (ThermoFisher Scientific) para facilitar a sua integração no genoma da célula. Após confirmada a linearização, por eletroforese em gel de agarose (ver 2.1.2), o DNA foi purificado e

procedeu-se à transfeção das HEK em placas p35. O procedimento de transfeção foi semelhante ao descrito em 2.3.1 tendo-se usado 1,2 µg de DNA e 5,4 µl de Metafectene. Passados dois dias, as células foram tripsinizadas – lavagem inicial com 1 ml de tripsina e processo de tripsinização com 0,5 ml de tripsina – e passadas para uma placa com 100 mm de diâmetro (p100, ThermoFisher Scientific) com 12 ml de meio suplementado com 200 µg/ml Higromicina B, iniciando-se assim o processo de seleção dos clones que incorporaram o plasmídeo pcDNA3-hygro-TAT-CFP e pcDNA3-hygro-TAT-FERM2.

Ao fim de uma semana em seleção, as células que sobreviveram e formaram clones individualizados foram isoladas mecanicamente (por raspagem e aspiração com uma micropipeta) e transferidas para uma placa com 24 poços (24-well, ThermoFisher Scientific) com 500 µl de meio com 200 µg/ml Higromicina B. Este procedimento foi feito mediante a observação das placas ao microscópio ótico invertido, que foi previamente colocado dentro da estufa e descontaminado com radiação UV.

O crescimento dos clones nas p24 foi monitorizado e os que iam apresentando um maior crescimento celular foram passados para uma placa p35, tendo sido retirada uma alíquota para analisar a expressão dos respetivos péptidos de fusão TAT por Western Blot. Estas alíquotas foram centrifugadas durante 5 minutos a 6000rpm, de modo a depositar todas as células, e os *pellets* foram posteriormente lavados com PBS e lisados em tampão SB 2x (100 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% (v/v) Glicerol, 4% (m/v) SDS, 130 mM DTT, 0,5 mg Azul Bromofenol) suplementado com 0,02 U de Nuclease universal (Pierce) e 5mM de MgCl₂ para degradar os ácidos nucleicos e reduzir a viscosidade das amostras, tendo sido analisados 40 µl das amostras por SDS-PAGE em géis de 1,5mm.

O tampão de lise utilizado para além de rebentar as células e, consequentemente, expor o seu conteúdo proteico, irá ainda alterar a conformação tridimensional das proteínas, através da quebra das ligações persulfureto, expondo as suas cadeias polipeptídicas. Após a lise, as amostras foram deixadas cerca de 20 minutos à temperatura ambiente, de modo a que o Nuclease atue, e posteriormente sofreram um outro processo de desnaturação a 95°C durante 10 minutos. A aquisição da estrutura secundária das proteínas é importante para que estejam disponíveis à ligação ao SDS aquando da eletroforese⁶⁷.

Os clones que apresentaram expressão dos péptidos de fusão TAT-CFP e TAT-FERM2 foram finalmente passados para frascos de cultura de 25cm² (T25, ThermoFisher Scientific) e, quando confluentes, foram criopreservados para utilização futura.

2.4 Eletroforese SDS-PAGE e Western Blot

A combinação das técnicas de eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) e *Western Blot* (WB) é uma prática recorrente para avaliar abundância relativa de proteínas de interesse numa determinada amostra.

A eletroforese SDS-PAGE permite separar as proteínas de uma determinada amostra consoante as suas massas moleculares através dos poros do gel, num tampão de SDS. O SDS é um detergente aniónico capaz de se ligar às cadeias polipeptídicas das proteínas induzindo a desnaturação das suas conformações tridimensionais e conferindo-lhes carga negativa. Assim, as proteínas ficam uniformemente com carga negativa e, quando aplicada uma corrente elétrica, migram para o polo positivo. Esta migração é

dependente unicamente da massa molecular das proteínas, sendo que proteínas mais pequenas migram mais facilmente ao longo do gel que proteínas maiores⁶⁷. A massa das proteínas é monitorizada e estimada com base num marcador de proteínas de massas conhecidas (*Precision Plus Protein™ Standards* – BIO-RAD) que é corrido em simultâneo com as amostras.

Os géis de poliacrilamida (mistura de acrilamida e bisacrilamida) utilizados foram formados verticalmente entre 2 vidros, com 0,75mm ou 1,5mm de espessura, num suporte para o efeito (BIO-RAD). Os géis são constituídos por duas fases com percentagens de poliacrilamida diferentes: um gel de concentração com uma percentagem de 4% que tem como intuito concentrar as amostras aplicadas de forma a ficarem numa mesma posição de “partida” quando for iniciada a separação; e um o gel resolvente, isto é, onde vão ser separadas as proteínas da amostra, que pode ter concentrações variáveis de poliacrilamida conforme o tamanho dos poros pretendido. Em ambos os casos, a mistura para a síntese dos géis é constituída por 4 a 10% de acrilamida:bisacrilamida (37.5:1, BIO-RAD), tampão Tris-HCl (BIO-RAD, 375mM, pH 8,8, para o gel resolvente e 62,5mM, pH 6,8 para o de concentração), 0,10% (m/v) SDS (Sigma-Aldrich) em água bi-destilada Mili-Q, sendo a polimerização dos mesmos iniciada após a adição de 0,1% (m/v) Persulfato de Amónio (APS, Sigma-Aldrich) e 0,0005% (v/v) N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED, VWR). Neste trabalho experimental utilizou-se ainda uma adaptação dos géis de poliacrilamida normais, que consistiu na adição de 1% (v/v) de glicerol com o objetivo de melhor separar as formas glicosiladas da proteína de membrana CFTR. A eletroforese com géis normais foi feita a amperagem constante de 20 mA/gel durante 60 minutos, enquanto os géis de glicerol foram corridos a voltagem constante de 150V, a 4°C e durante aproximadamente 1h e 45 minutos, em tampão SDS (8,7 mM SDS, 63 mM Tris e 480 mM Glicina).

Posteriormente, as proteínas já separadas por tamanho foram transferidas para uma membrana absorvente de difluoreto de polivinilideno (PVDF) através da aplicação de uma corrente elétrica⁶⁸. A transferência é feita num tampão de Blot (para géis de poliacrilamida normais - Blot Buffer 1X (48 mM Tris, 38,6 mM Glicina, 1,41 mM SDS), 20% (v/v) Metanol); para géis de poliacrilamida com glicerol - Blot Buffer 1X (24,8 mM Tris, 192 mM Glicina), 20% (v/v) Metanol) e dá-se do polo negativo para o polo positivo. Para este procedimento foi montada uma *sandwich* com uma esponja e 2 papéis de filtro 3MM em cada uma das extremidades, a fim de exercer pressão e manter uma superfície de contacto homogênea entre o gel de poliacrilamida previamente corrido e a membrana de PVDF (BIO-RAD) que lhe é colocada por cima, previamente hidratada, tal como ilustrado na Figura 2.1.

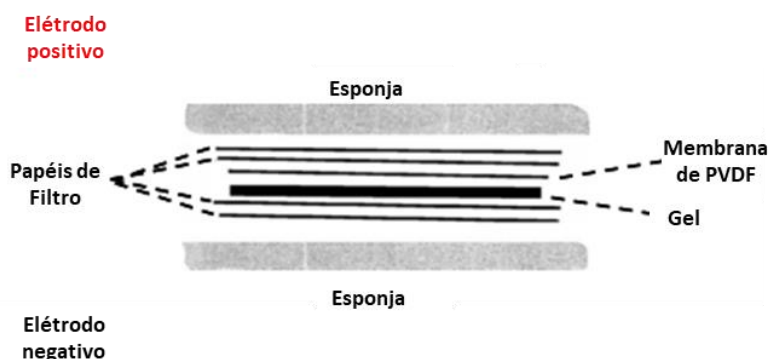


Figura 2.1 - Esquematisação da montagem da *sandwich* a utilizar na técnica de Western Blot. Adaptado de ⁶⁸.

A transferência por WB foi feita a voltagem constante de 100V, durante 1h para os géis normais e a amperagem constante de 300mA e em gelo durante 1h e 30 minutos para os géis de glicerol. Após a transferência a proteína transferida para a membrana de PVDF foi corada e fixada com uma solução de azul de Coomassie (0,25% (m/v) Azul Brilhante de Coomassie R-250, 45% (v/v) Metanol e 10% (v/v) Ácido acético em água bi-destilada) e o excesso lavado sob agitação com uma solução de descoloração (45% (v/v) Metanol e 10% (v/v) Ácido acético em água bi-destilada). De seguida a membrana foi lavada 3 vezes com uma solução de TBST (TBS + 0,05% (v/v) de Triton-X100 (TX-100, Sigma-Aldrich)), de modo a eliminar os resíduos de ácido acético, e incubada durante 1 hora numa solução de 5% (m/v) em TBST de leite magro em pó (Molico, Nestlé), em agitação. A incubação em leite tem como objetivo “bloquear” locais livres da membrana a fim de impossibilitar possíveis ligações inespecíficas dos anticorpos. A deteção das proteínas em estudo é feita através de uma primeira incubação da membrana, ou partes da membrana, com uma diluição apropriada (em TBST+5% leite) de um anticorpo primário específico O/N em agitação (Tabela 2.2). Posteriormente, a membrana foi lavada 3 vezes com a solução de TBST, para retirar o excesso de anticorpo primário que não se ligou à membrana, e incubada com um anticorpo secundário (desenvolvido contra as cadeias pesadas da espécie do anticorpo primário) conjugado com peroxidase de rábano (HRP), geralmente na diluição de 1:3000, durante 1h sob agitação. Por último, a visualização das proteínas na membrana é feita numa câmara escura com base num método de quimioluminescência e por autoradiografia. As membranas são postas em contacto com uma mistura de 2 soluções (A – 0,1 M Tris-HCl pH 8,8, 37,5 µM luminol (Roche), 0,4 µM ácido p-cumárico (Roche) e B – 0,1 M Tris-HCl pH 8,8, 49 mM peróxido de hidrogénio (H₂O₂, Sigma-Adlrch)) durante 1 minuto, tempo suficiente para o luminol, na presença de H₂O₂, ser oxidado pela HRP e se dar a reação de quimioluminescência⁶⁸. Imediatamente de seguida, as membranas são colocadas numa cassette própria e expostas a chapas raio-X que foram reveladas num revelador automático (*Medical X-ray Processor*, KODAK).

Tabela 2.2 - Anticorpos utilizados em *Western Blot* e respetivas diluições e tempo de incubação.

Anticorpo primário	Marca	Diluição utilizada	Anticorpo secundário	Marca	Diluição utilizada
IgG2b monoclonal de murganho anti-CFTR (596)	CF Foundation	1:60 000, O/N 1:5 000, 2h	Anti-IgG de murganho	BIO-RAD	1:3 000, 1h
IgG1 monoclonal de murganho anti-α-tubulina	Sigma-Aldrich	1:6 000, O/N 1:2 000, 1h			
IgG1 monoclonal de murganho anti-Flag (M2)	Sigma-Aldrich	1:1 000, O/N			

Os lisados celulares e as alíquotas de meio de cultura recolhidas para a produção dos péptidos de fusão TAT, em cada experiência, foram também sujeitas à técnica de WB de modo a avaliar a concentração de péptido nas amostras. O processo de lise iniciou-se com a lavagem das células com meio de cultura simples (MEM) e posteriormente foi feita uma raspagem das células com SB 2X suplementado com Nuclease e $MgCl_2$. A uma pequena fração das alíquotas de meio foi adicionado SB 1X, como tampão de aplicação, e as amostras (60µl) foram separadas por SDS-PAGE em géis de 1,5 mm.

Os níveis de expressão das proteínas em estudo foram quantificados densitometricamente a partir das chapas obtidas por autoradiografia através do programa ImageJ (download em <https://imagej.nih.gov/ij/>).

2.5 Biotinilação de Proteínas na Superfície Celular

A biotinilação de proteínas na superfície celular é uma técnica que, sob condições não permeabilizantes, permite analisar de forma seletiva a abundância relativa de proteínas de interesse na MP⁶⁹. Através desta técnica foi possível estudar a influência dos vários subdomínios FERM da Ezrina (FERM1, FERM2 e FERM3) nos níveis da proteína CFTR na superfície celular.

A parte inicial deste procedimento foi feita numa câmara fria a 4°C, e com as placas de cultura em gelo, onde as células são lavadas com PBS-CM (PBS pH 8, 0,1mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$) e incubadas com a Biotina (Sulfo-NHS-SS-Biotina, Santa Cruz) (0,5mg/ml em PBS-CM), durante 45 minutos. Durante este tempo, a biotina liga-se aos grupos amina das proteínas que estão na membrana através do grupo éster N-hidroxissulfosuccinimida (Sulfo-NHS). Esta reação é terminada após adição de uma solução Tris-Q (100mM Tris pH8, 150mM NaCl, 0,1mM $CaCl_2$, 1mM $MgCl_2$, 10 mM Glicina, 1% (m/v) BSA) que permite a ligação da biotina livre (i.e., que restou da ligação às proteínas da membrana) aos grupos amina do Tris e da proteína BSA. As células são posteriormente lisadas com 250 µl de PD Buffer (50 mM Tris pH 7,5, 100 mM NaCl, 10% (v/v) Glicerol, 1% (v/v) NP-40) ao qual foram adicionados inibidores de proteases (1,5 µM Aprotinina, 23 µM Leupeptina, 10 µM E64, 1 mM EGTA, 15 µM Pepstatina A, 1 mM fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 1mM 1,10-fenantrolina - todos Sigma-Aldrich). A 40 µl do lisado obtido, que contém a proteína total, isto é, as proteínas da membrana biotiniladas e as proteínas intracelulares, foi adicionado tampão SB CFTR 2x (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 3% (m/v) SDS, 10% (v/v) Glicerol, 0,02% (m/v) Azul Bromofenol) e 200 µl do restante lisado foram incubados, durante 1 hora sob agitação a 4°C, com *beads* de agarose-streptavidina (Invitrogen – ThermoFisher Scientific). Nesta etapa, as proteínas biotiniladas ligam-se por afinidade à streptavidina, ficando ancoradas nas *beads* que são posteriormente lavadas 5 vezes com uma solução de lavagem (100 mM Tris pH 7,5, 300 mM NaCl, 1% (v/v) TX-100). Finalmente as *beads* são secas com uma agulha fina e a ligação das proteínas às *beads* é quebrada pela adição de 18 µl de SB CFTR 2x e de 2 µl de DTT 1M, agente redutor que quebra a ligação persulfureto (SS) do complexo Proteína-Sulfo-NHS-SS-Biotina.

Os lisados totais (10 µl) e os *pull-downs* (20 µl) foram posteriormente analisados por WB, sendo em ambos os casos feita deteção com anticorpo anti-CFTR (clone 596, CFF) e anti- α -tubulina (Sigma-Aldrich) que, no caso dos lisados totais, funciona como controlo da

quantidade de proteína carregada no poço, e para os *pull-downs* permite avaliar possíveis contaminações com proteína intracelular.

2.6 Ensaio de influxo de iodeto

O ensaio de influxo de iodeto tem como principal objetivo o estudo do transporte de iões cloreto através do canal CFTR. Para isso foram utilizados clones estáveis de CFBE F508del que expressam também a proteína fluorescente YFP (*Yellow Fluorescent Protein*) mutada (YFP-F46L/H148Q/I152L)⁷⁰. As mutações H148Q e I152L tornam o YFP bastante mais sensível ao iodeto do que ao cloreto, sendo as concentrações necessárias para que ocorra a diminuição de metade da fluorescência máxima do YFP mutado de 1,9 mM para o I⁻ e de 85mM para o Cl⁻ (~45 vezes mais)⁷¹. Deste modo, ao induzir-se a ativação do canal CFTR, por aumento dos níveis citoplasmáticos de cAMP através da estimulação das células com os compostos Forscolina e Genisteína, é desencadeada uma secreção de Cl⁻, proporcional à quantidade e funcionalidade do canal CFTR na membrana das células. Se estas células forem então expostas a um meio em que se substituiu o Cl⁻ por iodeto, os iões I⁻ em excesso irão entrar para as células para repor os iões Cl⁻ secretados e diminuir proporcionalmente a intensidade de fluorescência do YFP. Já a mutação F46L teve como único objetivo aumentar o *folding* do YFP e consequentemente a sua intensidade de fluorescência, não afetando a sensibilidade do YFP aos haletos⁷².

Neste trabalho experimental este ensaio foi utilizado com o objetivo de estudar o efeito dos péptidos de fusão TAT-CFP e TAT-FERM2 na atividade da CFTR corrigida com VX-809 a 30°C. O ensaio foi feito em *chamber slides* de 8 poços (Nunc) onde se colocaram 2 x 10⁵ células/poço em meio de cultura apropriado (ver 2.3). Após aproximadamente 24h o meio foi renovado e as células tratadas com 5 µM de VX-809, durante 24h a 30°C. Posteriormente, os meios foram substituídos por 150 µl dos meios de cultura recolhidos de HEK293 que continham o péptido de fusão TAT-CFP ou TAT-FERM2 e as células foram deixadas a 37°C durante 4h, para destabilizar e remover da membrana o canal CFTR-F508del resgatado pelo tratamento com VX-809 a baixa temperatura, e permitir determinar eventuais efeitos estabilizadores dos péptidos TAT. O restante ensaio foi feito à temperatura ambiente onde as células foram lavadas 2 vezes com uma solução de WPBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,7 mM CaCl₂, 1,1 mM MgCl₂, 1,5 mM KH₂PO₄, 8,1 mM Na₂HPO₄, pH 7.4) e posteriormente incubadas com 100 µl de WPBS com 10 µM de Forscolina (Sigma-Aldrich) e 20 µM de Genisteína (Sigma-Aldrich), na presença ou ausência de um inibidor da CFTR – 25 µM CFTR I172 (Sigma-Aldrich) –, durante 30 minutos (no caso das condições com inibidor da CFTR, as células foram previamente incubadas durante 10 minutos com 100 µl de WPBS com I172). As células foram observadas no microscópio de fluorescência confocal Leica TCS-SPE (comprimento de onda de excitação de 505 nm e comprimento de onda de emissão de 535 nm) tendo-se inicialmente gravado uma imagem da fluorescência basal das células. Finalmente, o decaimento da fluorescência foi medido a cada 500ms durante 5 s e depois durante mais 20 segundos após se ter adicionado rapidamente (<1 s) 200 µl de uma solução de YPBS (137 mM NaI, 2,7 mM KCl, 0,7 mM CaCl₂, 1,1 mM MgCl₂, 1,5 mM KH₂PO₄, 8,1 mM Na₂HPO₄, pH 7.4).

2.6.1 Quantificação do decréscimo de fluorescência e taxas de influxo

A variação da intensidade média da fluorescência ao longo do tempo foi determinada usando o programa *ImageJ* com recurso ao *plugin Time Series Analyzer*, fazendo a subtração do *background* usando referências sem células e normalizando os valores ao tempo 0, isto é, imediatamente antes da adição de I⁻. Os valores do decaimento de fluorescência foram então ajustados a curvas de decaimento exponencial (por regressão não-linear usando o software *solver* do *Microsoft Excel*) e as taxas de influxo inicial de I⁻ nas células foram calculadas a partir do declive das curvas através da fórmula $d[I^-]/dt = K_d [d(F/F_0)/dt]$, onde K_d é a constante de afinidade do YFP ao I⁻ e F/F_0 é a razão da intensidade de fluorescência medida num dado tempo e a intensidade de fluorescência inicial.

2.7 Imunofluorescência e microscopia confocal

A técnica de imunofluorescência (IF) tem como aplicabilidade a localização intracelular de proteínas ou estruturas celulares através da utilização de anticorpos específicos. A deteção pode ser feita de forma direta ou indireta, sendo que na primeira é usado apenas um anticorpo que está conjugado com um fluoróforo e na segunda é usado inicialmente um anticorpo primário específico para a proteína a localizar e de seguida um anticorpo secundário que está conjugado com determinado fluoróforo e irá reconhecer o anticorpo primário. Cada fluoróforo tem propriedades espectrais específicas pelo que quando excitado por um laser no seu comprimento de onda de excitação irá emitir fluorescência a um comprimento de onda superior específico que será detetada pelo microscópio de fluorescência confocal (TCS-SPE, Leica).

2.7.1 Localização do péptido de fusão TAT-CFP nas células

Neste trabalho recorreu-se à técnica de IF para estudar a localização dos péptidos de fusão TAT nas células em conjunto com o citoesqueleto de actina.

Com este intuito utilizou-se células CFBE F508del que foram colocadas a crescer em lamelas, previamente esterilizadas à chama, numa placa p60 com aproximadamente 1×10^6 células. No dia seguinte, após as células aderirem às lamelas, estas foram colocadas individualmente numa placa p24 e tratadas com os meios de cultura recolhidos com o péptido de fusão TAT-CFP e para a condição controlo com CFP EV durante 4h.

Posteriormente, as células foram lavadas 3 vezes com PBS⁺⁺ (137 mM NaCl, 12 mM Fosfato, 2,7 mM KCl, pH 7,4, 0,5 mM MgCl₂, 0,1 mM CaCl₂) em gelo e fixadas com uma solução de paraformaldeído a 4% (v/v) (PFA, Merck) durante 20 minutos. De seguida as células foram permeabilizadas, com uma solução de PBS com 0,2% (v/v) de TX-100. Ao fim de 10 minutos as células foram submetidas a 3 lavagens de 5 minutos cada com uma solução de PBST (PBS + 0,05% (v/v) TX-100). A deteção dos filamentos de actina foi feita com Faloidina conjugada com o fluoróforo Isotiocianato de Tetrametilrodamina (Faloidina-TRITC, Invitrogen), na diluição de 1:500 (em PBST), numa câmara húmida, onde se colocou o lado das lamelas onde estavam as células em contato com 10 µl de anticorpo, durante 30

minutos. Posteriormente as células foram lavadas 3 vezes com PBST, fixadas com PFA 4% durante 10 minutos e novamente lavadas 2 vezes com PBST. Por fim, as lamelas foram montadas numa lâmina, previamente limpa com uma solução de Etanol a 96%, com o auxílio de uma pinça em meio de montagem (VectaSheild, VETOR). O excesso de meio de montagem foi retirado com papel higiênico exercendo-se uma pressão suave e de seguida foi aplicado verniz transparente nos bordos das lamelas de forma a selá-las e fixá-las à lâmina.

As lâminas foram observadas ao microscópio de fluorescência confocal onde o CFP foi excitado por um laser de comprimento de onda de 405 nm e o TRITC a por um laser de 532 nm, emitindo fluorescência máxima a 485 nm e 570 nm, respetivamente.

2.8 Transferência de energia por ressonância de Förster (FRET)

A transferência de energia de ressonância de Förster, ou transferência de energia de ressonância de fluorescência, é uma técnica de fluorescência que permite observar interações proteína-proteína, ou estudar a estrutura de uma dada proteína, através da transferência de energia entre dois fluoróforos diferentes associados às proteínas, ou partes das proteínas, em estudo. Se as proteínas estiverem próximas o suficiente, a energia emitida pelo fluoróforo doador, quando excitado ao seu comprimento de onda, irá excitar o fluoróforo aceitador que emitirá fluorescência no seu comprimento de onda específico. Deste modo, após a excitação do fluoróforo doador apenas é detetada emissão de fluorescência do aceitador se as proteínas associadas a estes estiverem muito próximas, sendo portanto indicativo de que está a ocorrer interação entre elas.

2.8.1 Estudo da conformação da proteína NHERF1- Δ PDZ1

A técnica de FRET foi aplicada neste trabalho no estudo da conformação da proteína NHERF1 deletada no seu domínio PDZ1 (NHERF1- Δ PDZ1) (ver 3.3).

Para tal, foram usadas células BHK cultivadas numa 6-well (VWR) e em lamelas de vidro, que foram co-transfetadas com 2 μ g de DNA total tal como indicado em 3.3. No dia seguinte, o meio de cultura foi renovado para DMEM F-12 + 0,5%FBS e, quando necessário, as células foram adicionalmente tratadas como indicado (ver 3.3). As células foram então lavadas com PBS⁺⁺ em gelo, fixadas com PFA 4% durante 20 minutos e novamente lavadas com PBST em agitação.

As lâminas foram observadas ao microscópio confocal de fluorescência (TCS-SPE, Leica) onde os controlos CFP e o YFP foram excitados a 405 nm e 488 nm, emitindo no intervalo entre 440-503 nm e 540-650 nm, respetivamente. Nas restantes condições, a ocorrência de FRET foi observada quando houve emissão de fluorescência entre 540-650 nm através da excitação a 405 nm.

2.9 Análise estatística

Quando indicado, as diversas condições experimentais foram comparadas com os respectivos controlos usando o teste T de Student, considerando uma variância equivalente e uma distribuição bicaudal. Admitiu-se significado estatístico quando o valor de p foi inferior a 0,05.

3. Resultados

3.1 Estabilidade da CFTR-F508del na membrana plasmática

Como visto anteriormente, a ativação da proteína Ezrina é uma etapa bastante importante na estabilidade da CFTR-F508del na MP. Para além de esta ativação permitir ao domínio FERM da proteína Ezrina interagir com a porção C-terminal do NHERF1, formando-se assim o complexo macromolecular CFTR-NHERF1-Ezrina, este passo induz ainda a alteração conformacional da proteína adaptadora NHERF1 tornando o seu domínio PDZ2 também disponível à ligação à CFTR, prevenindo a endocitose do canal e, consequentemente, fortalecendo a sua retenção na superfície celular⁴¹.

Estas evidências levantaram a hipótese de ser possível criar um péptido bioativo, derivado da porção N-terminal da Ezrina, para agir como um estabilizador na MP da CFTR-F508del resgatada farmacologicamente. Para tal, foi inicialmente necessário identificar se, dentro da porção que contém os 320 aminoácidos do domínio FERM (ver Figura 1.5), existiria uma região particularmente essencial para a interação com o NHERF1 e retenção membranar da CFTR-F508del. Como descrito na introdução (ver 1.2), a análise cristalográfica do domínio globular FERM (ou N-ERMAD) da Ezrina revelou que este é composto por três módulos estruturais (FERM1, FERM2 e FERM3) que, juntos, formam uma estrutura compacta em forma de trevo (Figura 3.1.A)⁷³. Como ponto de partida para este trabalho, foi decidido avaliar se algum destes subdomínios, cada um com cerca de 100 aminoácidos, seria suficiente para induzir a disponibilização do domínio PDZ2 do NHERF1 e a consequente retenção na MP da CFTR-F508del resgatada farmacologicamente. Para tal, a construção pECFP-Ezrina Δ Ct, descrita anteriormente pelo grupo de acolhimento⁴¹, foi utilizada para gerar três novas construções contendo, individualmente, cada um dos 3 subdomínios FERM da ezrina (CFP-FERM1, CFP-FERM2, CFP-FERM3)⁷⁴ (Figura 3.1.B).

3.1.1 Efeito dos subdomínios FERM da proteína Ezrina

Com o objetivo de estudar o efeito dos subdomínios FERM da Ezrina na retenção da CFTR-F508del na MP recorreu-se à técnica de biotinylation de proteínas na superfície celular, tendo-se utilizado como modelo de estudo células CFBE41o-, imortalizadas com o antígeno T-grande do vírus SV40 a partir de células do epitélio brônquico de um doente com FQ⁷⁵, modificadas para sobreexpressarem a proteína CFTR humana com a mutação F508del – CFBE F508del⁷⁶.

As células foram tratadas com um corretor específico para esta mutação, o VX-809, durante 24h a fim de corrigir o processamento e tráfego da CFTR-F508del. Este tratamento foi feito a 30°C para potenciar a correção farmacológica reduzindo a instabilidade térmica da proteína mutante, o que faz aumentar a sua estabilidade e abundância na MP (Figura 3.2, comparar 2º e 3º poços). De seguida, as células foram transfectadas com construções de deleção da proteína Ezrina (CFP-FERM1, CFP-FERM2, CFP-FERM3 e CFP-Ezrina Δ Ct) (Figura 3.1.B) e com o próprio vector pECFP vazio (CFP EV) como controlo, nas condições indicadas em 2.3.1., tendo sido renovado o meio de cultura para meio com 5 μ M VX-809 e

as células novamente incubadas a 30°C. Ao fim de novas 24h, as células foram incubadas durante 4h a 37°C, temperatura à qual a CFTR-F508del corrigida pelo VX-809, que estava até então na MP, é destabilizada e internalizada (Figura 3.2, comparar 2º e 4º poços). Os controles de temperatura foram tratados de igual forma com VX-809 e transfetados com o vector CFP EV, sendo que estiveram sempre à temperatura de 30°C ou 37°C. Além destes, foi realizado ainda um controlo do ensaio de Biotinilação, onde não foi adicionada biotina, com o objetivo de confirmar a integridade das células e a robustez do ensaio.

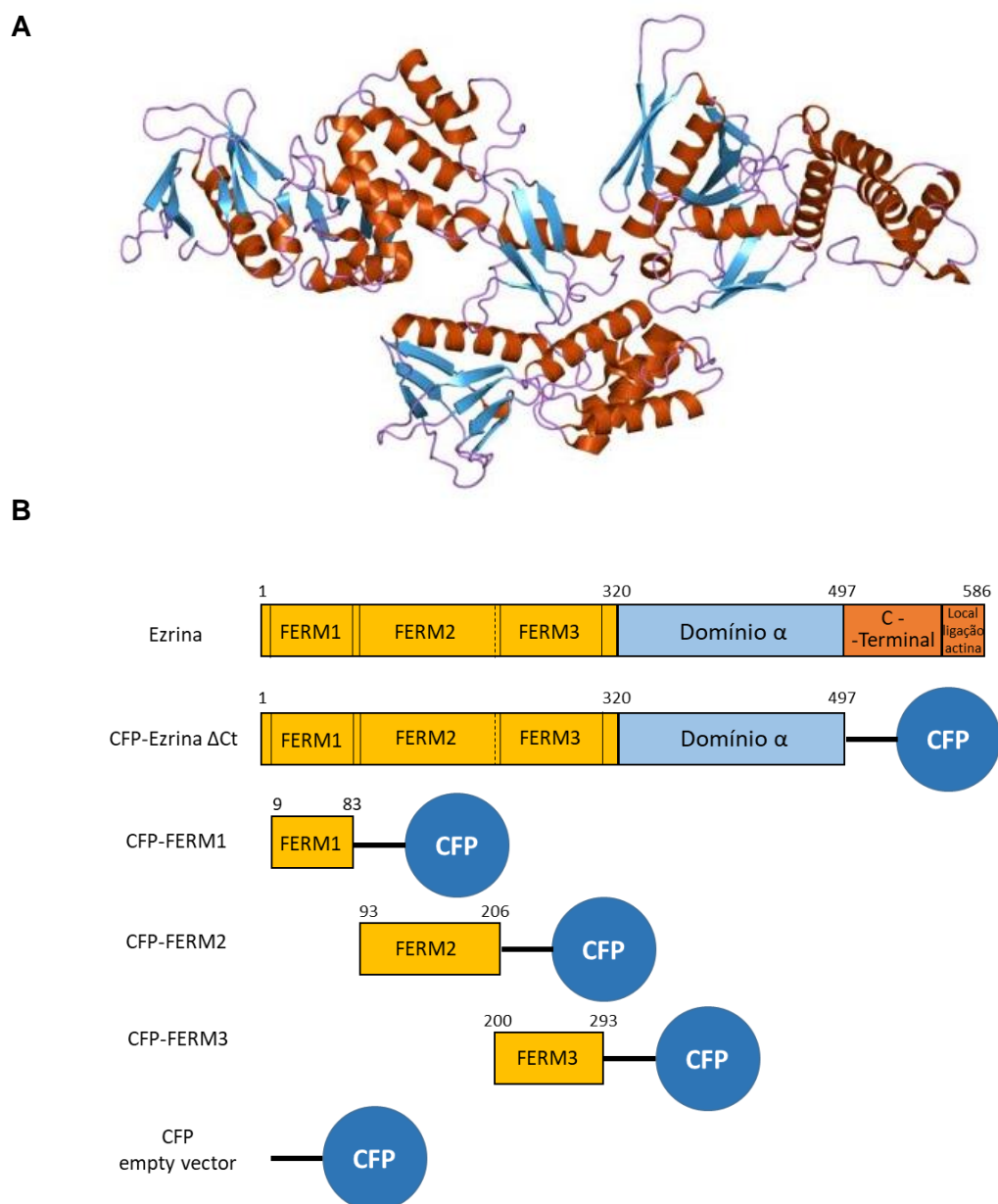


Figura 3.1 - A) Representação da estrutura molecular do domínio FERM da proteína Ezrina (adaptado de *Protein Database - PDB 1gg3 EBI*); **B)** Esquema da estrutura da proteína Ezrina e das várias construções de deleção da Ezrina clonadas no vector pECFP-C3.

Assim, foi possível avaliar o efeito estabilizador dos subdomínios FERM1, FERM2, FERM3 e Ezrina Δ Ct na CFTR-F508del durante o período em que as células estiveram a 37°C, ao impedir a internalização do canal. Os lisados totais e a proteína capturada pela ligação da biotina às beads de agarose-streptavidina foram analisados por WB.

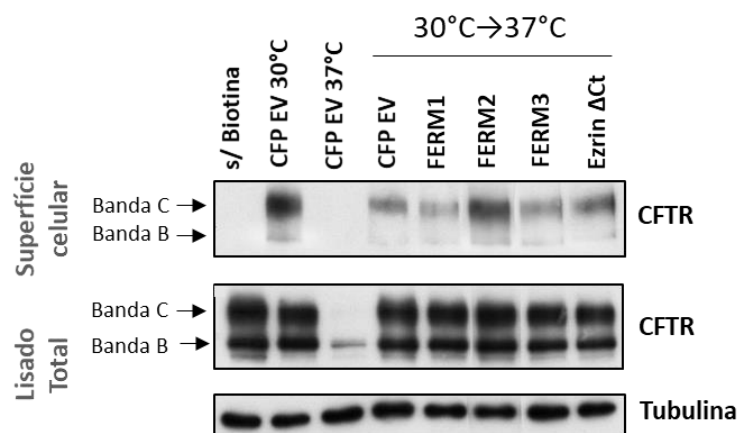


Figura 3.2 - Efeito dos subdomínios da Ezrina na estabilidade da CFTR-F508del na MP. As células CFBE F508del foram tratadas com VX-809 a 30°C durante 48h e posteriormente transferidas para 37°C durante 4h a fim de estudar o efeito dos subdomínios da Ezrina transfetados na estabilização do canal. Os três primeiros poços correspondem aos controles da experiência, sendo o primeiro o controle do ensaio de Biotinilação e os dois seguintes os controles de temperatura, em que as células, transfetadas com CFP EV, foram mantidas sempre a 30°C e a 37°C, respetivamente.

Analisando a Figura 3.2, é possível observar que a internalização da CFTR-F508del aquando da alteração da temperatura para 37°C é claramente reduzida na presença do subdomínio FERM2 (6º poço), verificando-se que uma grande parte da proteína se mantém na MP. Este efeito é superior ao observado para as células transfetadas com a Ezrina Δ Ct (8º poço) que permite uma internalização parcial da CFTR-F508del, embora menos pronunciada do que a observada na situação controlo (CFP EV, 30°C→37°C, 4º poço).

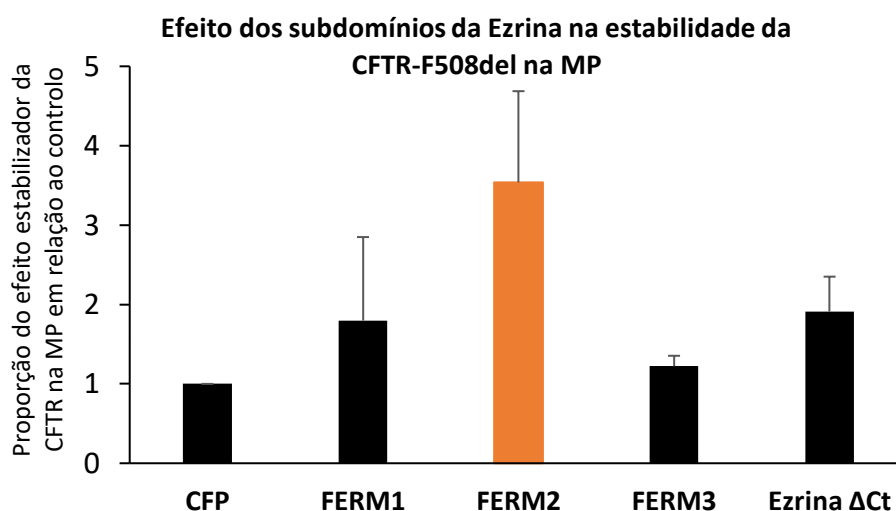


Figura 3.3 - Análise do efeito dos subdomínios da Ezrina na estabilização da CFTR-F508del tratada com VX-809 na MP. Os resultados foram normalizados em relação à situação controlo (CFP EV, 37°C→30°C) e estão representados os valores médios dos dois ensaios independentes realizados e os respetivos erros padrão da média.

A quantificação por densitometria das bandas de WB em três ensaios independentes permitiu concluir que o subdomínio FERM2 da Ezrina promove um aumento de aproximadamente 4 vezes, relativamente à situação controlo, na retenção da CFTR-F508del resgatada na MP, sensivelmente o dobro do valor atingido com a sobreexpressão de Ezrina ΔCt (Figura 3.3).

3.2 Construção de um péptido de fusão TAT

O objetivo seguinte do trabalho consistiu em desenhar uma estratégia para gerar um péptido bioativo, com base no subdomínio FERM2 da Ezrina, que fosse entregue nas células de modo a produzir o seu efeito estabilizador na CFTR-F508del resgatada para a MP. Com este objetivo, baseámo-nos no trabalho de Nagahara *et al.* (1998)⁵⁹, tendo-se utilizado o domínio de transdução da proteína Tat do vírus HIV, constituído por 11 aminoácidos (YGRKKRRQRRR) para produzir um péptido de fusão com o subdomínio FERM2, esperando conferir a este último a capacidade de atravessar autonomamente a membrana celular e exercer os efeitos.

A estratégia inicial, baseada em Nagahara *et al.* (1998), consistia na produção e purificação do péptido de fusão em bactérias, que posteriormente seria adicionado às células alvo. No entanto, quando calculada a solubilidade do péptido de fusão Tat-FERM2 (através de um algoritmo disponível em <http://biotech.ou.edu/>⁷⁷) percebeu-se que este seria extremamente difícil de isolar a partir de extratos de *E. coli*, o que poderia inviabilizar a sua purificação.

Deste modo, a solução passou pela produção do péptido de fusão em células de mamífero, com a intenção de que estas o secretassem para o meio de cultura, que poderia ser então utilizado para tratar as células alvo, ou de onde o Tat-FERM2 poderia vir a ser também purificado *a posteriori*. Assim, foi necessário adicionar à construção inicial do péptido de fusão uma sequência péptido-sinal da proteína prolactina que tem como função conduzir a produção do péptido de fusão para a via secretora a fim de poder ser então libertado no meio extracelular. O péptido de fusão desenvolvido conta ainda na sua constituição com duas marcas peptídicas (*Tags*): uma sequência de polihistidina (6x *His*), que permitirá a purificação deste por incubação com resinas de afinidade comerciais, contendo iões divalentes de níquel ou cobalto; e uma sequência *Flag*, que possibilitará a deteção dos péptidos de fusão por WB. Foi ainda incluída uma sequência de ligação flexível (*Flexible linker*, GSGGS) a separar o FERM2 da restante construção, de forma a minimizar eventuais impedimentos estéricos na ligação de FERM2 a NHERF1 em complexo com a CFTR-F508del na membrana. De forma a simplificar a nomenclatura do péptido de fusão, o conjunto dos últimos constituintes mencionados passará a denominar-se por “TAT” e o péptido de fusão por “TAT-FERM2”, tal como representado na figura (Figura 3.4.A).

A



B

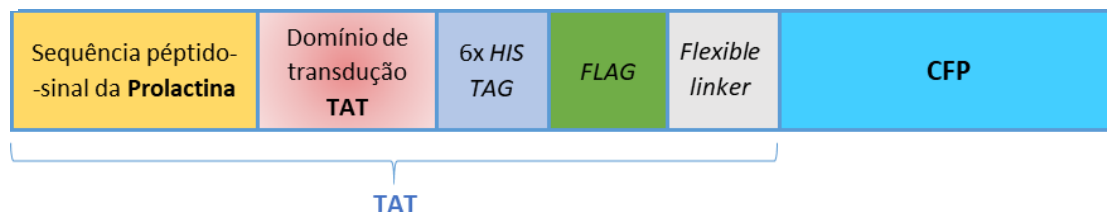


Figura 3.4 - Esquema da constituição dos péptidos de fusão TAT-FERM2 e TAT-CFP. **A)** Para além da sequência do FERM2, responsável pela estabilização da CFTR-F508del na MP, o péptido de fusão TAT-FERM2 é ainda constituído por uma sequência péptido-sinal da Prolactina, pelo domínio de transdução da proteína Tat, uma sequência 6x *His*, uma marca *Flag* e um *linker* flexível. De forma a simplificar a nomenclatura do péptido de fusão, o conjunto dos últimos constituintes mencionados passa a denominar-se de “TAT”, tal como representado na figura. **B)** O péptido de fusão controlo – TAT-CFP – foi criado através da substituição da sequência codificante do FERM2 pela do CFP (proteína fluorescente ciano), após a clonagem do TAT-FERM2 no pcDNA3-hygro.

O péptido de fusão TAT-FERM2 foi posteriormente clonado num vector de expressão em células de mamífero, o pcDNA3-hygro, e foi ainda criado um péptido de fusão controlo em que a sequência codificante para o FERM2 foi substituída pela do CFP (proteína fluorescente ciano, Figura 3.4.B).

3.2.1 Estudo da expressão e função autócrina do péptido de fusão TAT-FERM2 em células CFBE F508del

Após montagem da construção de fusão TAT-FERM2, uma das etapas seguintes consistiu em avaliar se esta era ectopicamente expressa quando transfetada em células de mamífero e se, sendo expresso no modelo celular CFBE F508del, o péptido recombinante produzido seria secretado para o meio de cultura, atuando de forma autócrina, e estabilizando a CFTR-F508del resgatada com VX-809 na MP destas células.

Neste sentido, células CFBE F508del que foram transfetadas com a construção TAT-FERM2 e, como controlos, com o TAT-CFP e CFP EV, na presença ou ausência de tratamento com 5 μ M de VX-809 durante 24h a 37°C. Após a lise celular, as amostras foram analisadas por WB (Figura 3.5). A deteção com anti-*Flag* permitiu confirmar a expressão de ambos os péptidos de fusão nestas células. Observou-se ainda, pela análise dos níveis de banda B e banda C da CFTR, que, mesmo na ausência de tratamento com VX-809, a presença de TAT-FERM2 leva a um aumento da abundância de banda C (Figura 3.5, 3º poço), consistente com uma maior estabilidade da pequena quantidade de proteína F508del que consegue escapar ao controlo de qualidade no RE e chegar à MP. Em células tratadas com o corretor VX-809 este efeito estabilizador torna-se ainda mais claro (Figura 3.5, 6º poço).

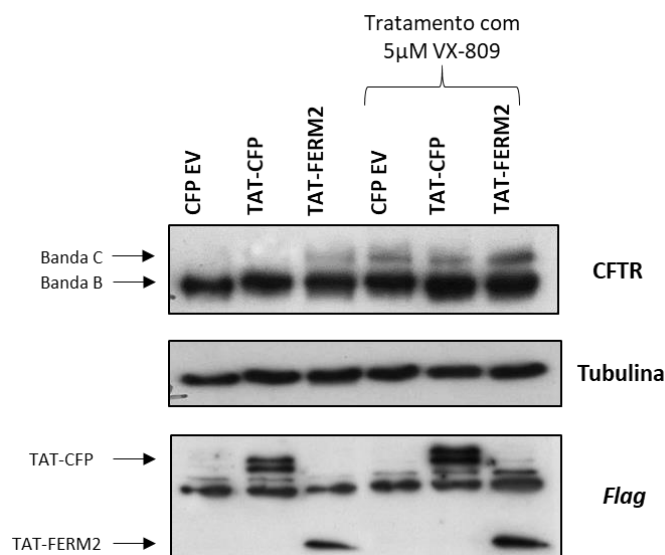


Figura 3.5 - Estudo da expressão e do efeito autócrino do péptido de fusão TAT-FERM2 em células CFBE F508del. As células foram transfetadas com CFP EV, TAT-CFP e TAT-FERM2, como descrito na figura, e incubadas durante 24h na ausência ou na presença de 5 μ M de VX-809. Os painéis mostram imagens de WB representativas da proteína CFTR detetada com anti-CFTR (596), dos péptidos de fusão detetados com anti-Flag e da detecção com anti-tubulina, como controlo da proteína total carregada em cada poço do gel.

Conclui-se assim que a construção de fusão TAT-FERM2 é passível de ser expressa em células de mamífero, parecendo ser secretada e conseguir atuar de forma autócrina nas células CFBE F508del, sendo transduzida de volta nestas células via Tat e estabilizando a forma madura (banda C) da CFTR-F508del.

3.2.2 Escolha da linha celular para produção do péptido de fusão TAT-FERM2

Como a eficiência de transfeção (% de células transfetadas) destas construções em células CFBE não ultrapassou os 20-30% (avaliados por microscopia de fluorescência em células transfetadas com TAT-CFP) optámos por testar outras linhas celulares para a produção e secreção do péptido recombinante TAT-FERM2. Foram escolhidas para tal as células BHK (baby hamster kidney) e HEK 293 (human embrionic kidney) uma vez que são linhas com uma alta eficiência de transfeção.

Numa primeira abordagem, a produção dos péptidos de fusão foi testada nas células BHK que foram transfetadas com o TAT-FERM2 e, como controlos, com o TAT-CFP e vetor CFP EV. Posteriormente, foram recolhidas alíquotas dos meios de cultura, passadas 24h e 48h, após as quais as células foram lisadas e os lisados celulares analisados por WB juntamente com as alíquotas de meio de cultura condicionado recolhidas (Figura 3.6).

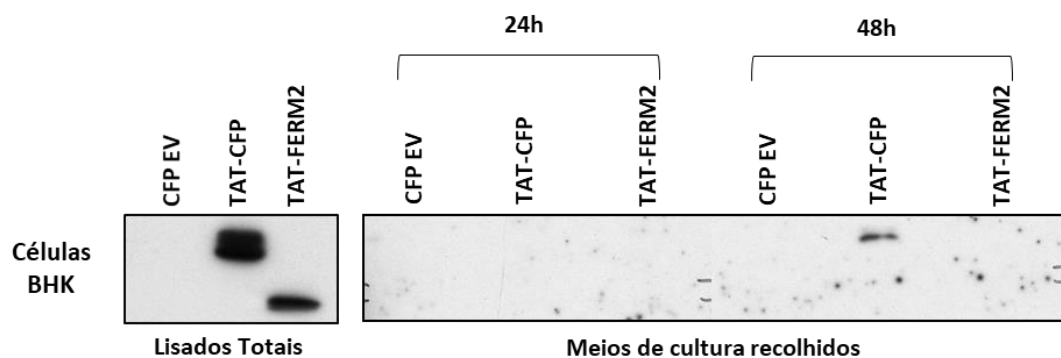


Figura 3.6 - Estudo da produção do péptido de fusão TAT-FERM2 em células BHK. Os meios de cultura recolhidos às 24h e 48h após a transfeção e os lisados celulares foram analisados por WB. Para ambos os casos, a deteção foi feita com anti-Flag.

Verificou-se que, apesar das células BHK expressarem ambos os péptidos de fusão TAT, apenas foram capazes de secretar o péptido de fusão controlo, o TAT-CFP, para o meio de cultura e em quantidades bastantes reduzidas.

Assim, numa segunda abordagem foram então testadas as células HEK 293, nas quais se realizou o mesmo tipo de estudo sendo que, para além das 24h e 48h mencionadas anteriormente, foi também recolhido meio de cultura 72h após a transfeção, altura em que se procedeu à lise das células.

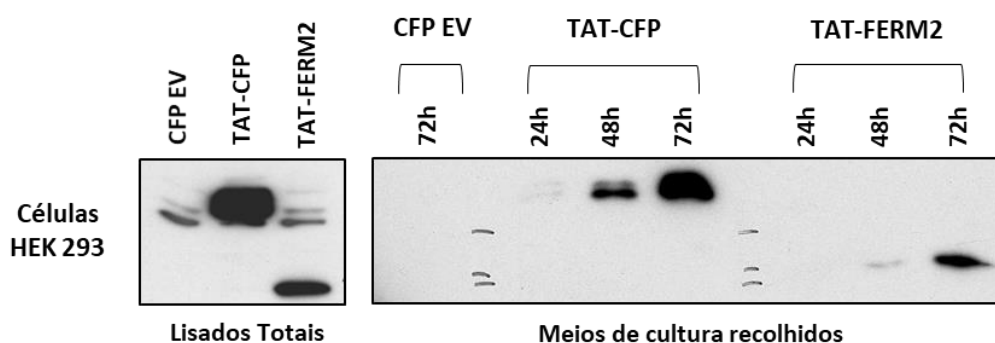


Figura 3.7 - Estudo da produção do péptido de fusão TAT-FERM2 em células HEK 293. Os meios de cultura recolhidos às 24h, 48h e 72h após a transfeção e os lisados celulares foram analisados por WB. Para ambos os casos, a deteção foi feita com anti-Flag.

Já as células HEK 293, que expressaram o TAT-FERM2 em quantidades semelhantes às células BHK, apresentaram melhores resultados no que diz respeito à secreção dos péptidos de fusão TAT para o meio, mesmo às 48h. Ainda que a expressão e secreção de TAT-CFP tenha sido novamente mais eficiente, as HEK 293 foram capazes de secretar uma quantidade significativa de TAT-FERM2 para o meio às 72h após a transfeção. Assim, esta foi a linha celular escolhida para a produção do péptido de fusão TAT-FERM2.

3.2.3 Localização celular do péptido de fusão TAT-CFP

Uma vez conseguida a produção e secreção de níveis detetáveis de ambas as construções TAT foi importante perceber se estas possuíam a capacidade de atravessar a MP e penetrar as células. Para tal, utilizou-se o meio condicionado recolhido de HEK 293 a secretarem TAT-CFP, que possui fluorescência própria devido à presença de CFP, e adicionámo-lo a células CFBE F508del. Como controlo desta experiência, as mesmas células foram também tratadas em paralelo com o meio recolhido das células HEK transfectadas com CFP EV, sendo a duração de ambos os tratamentos de 4h.

As células tratadas foram então analisadas por microscopia de fluorescência confocal, após terem sido lavadas, fixadas e coradas com Faloidina-TRITC, que marca o citoesqueleto de actina permitindo a visualização dos contornos celulares (Figura 3.8.A e B).

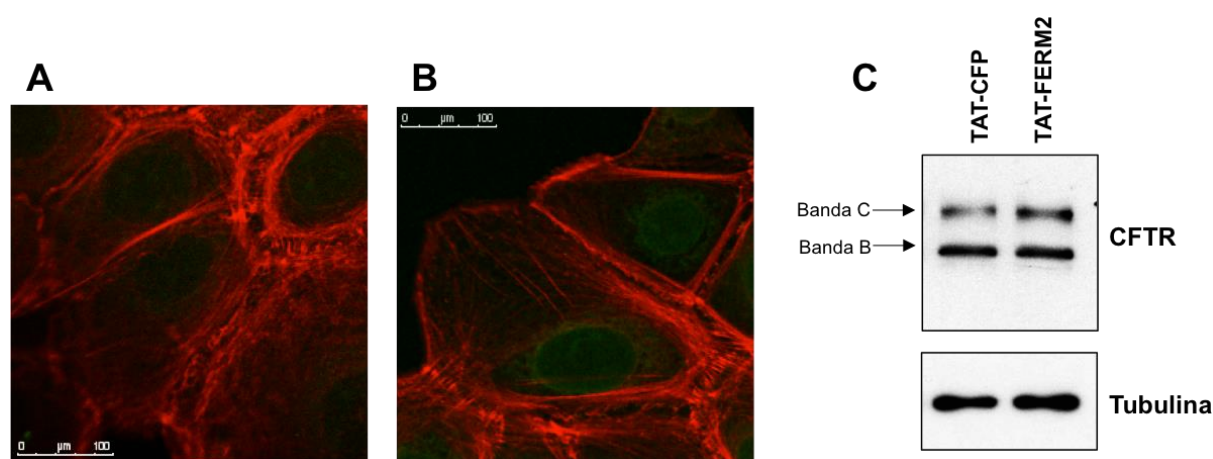


Figura 3.8 - Localização do péptido TAT-CFP em células CFBE F508del e efeito do péptido de fusão TAT-FERM2 na CFTR-F508del resgatada com VX-809. **A, B)** As células foram tratadas com os meios recolhidos de células HEK 293 que expressavam (A) CFP EV, como controlo, e (B) TAT-CFP durante 4h. As imagens de microscopia de fluorescência confocal foram obtidas pelo *Software* Leica. **B)** Na imagem é possível observar a localização do péptido de fusão TAT-CFP (a verde) e do citoesqueleto de actina (a vermelho). **C)** As células CFBE F508del foram tratadas 24h com 5 μ M de VX-809 e posteriormente incubadas, durante 4h, com os meios condicionados recolhidos de HEK 293 que secretavam TAT-CFP e TAT-FERM2. Na figura é possível observar que o TAT-FERM2, ao ser transduzido para as células, promove a estabilização da forma madura (banda C) da CFTR-F508del.

Foi assim possível observar, em comparação com as condições controlo (Figura 3.8.A), a presença do péptido de fusão TAT-CFP dentro das células, tanto no núcleo, uma vez que o domínio TAT contém uma sequência de localização nuclear⁵⁷, como no citoplasma (Figura 3.8.B). De seguida, expusemos células CFBE F508del, tratadas 24h com 5 μ M de VX-809, a 4h de incubação com meios condicionados contendo TAT-CFP e TAT-FERM2. Tal como tinha sido verificado para a expressão e ação autócrina dos péptidos de fusão nestas células (Figura 3.5), também as 4h de incubação com o meio condicionado TAT-FERM2 das células HEK foi suficiente para se visualizar um aumento da abundância de banda C da CFTR-F508del, relativamente ao controlo TAT-CFP (Figura 3.8.C).

Deste modo, os resultados sugerem que ambos os péptidos de fusão TAT, expressos e secretados pelas células HEK 293, têm a capacidade de penetrar a membrana celular das células CFBE e, no caso do péptido TAT-FERM2, ajudar a estabilizar a forma madura da CFTR-F508del resgatada quimicamente com o corretor VX-809.

3.2.4 Efeito do péptido de fusão TAT-FERM2 na atividade da CFTR-F508del

Com o intuito de estudar o efeito do péptido TAT-FERM2, secretado pelas células HEK 293, na atividade do canal CFTR-F508del realizaram-se ensaios de influxo de iodeto em células CFBE F508del a expressarem estavelmente o triplo mutante F46L/H148Q/I152L do YFP cuja fluorescência é sensível a haletos (HS-YFP), particularmente ao iodeto ($K_d \sim 2$ mM para o I^- vs. 100 mM. para o Cl^-)⁷¹.

As células foram inicialmente incubadas com 5 μ M de VX-809 durante 24h a 30°C a fim de promover a correção e resgate da CFTR-F508del para a MP. Posteriormente, estas foram incubadas a 37°C durante 4h (para promover a destabilização térmica da CFTR-F508del resgatada para a membrana) com os meios condicionados das células HEK 293, contendo ou o péptido de fusão TAT-FERM2 ou o controlo TAT-CFP.

O influxo de iodeto foi observado pelo decréscimo da fluorescência do HS-YFP nas células aquando da adição de excesso de iões iodeto às células (aos 5s do ensaio). Este influxo decorre do défice de iões Cl^- resultante da estimulação prévia da atividade da CFTR nas células pelo tratamento com Forscolina (que estimula a produção de cAMP) e Genisteína (um potenciador da atividade da CFTR). Assim, uma maior diminuição da fluorescência observada corresponde a uma maior entrada de iões iodeto nas células, o que traduz uma maior atividade da CFTR-F508del na MP, com a consequente saída de mais iões Cl^- . A especificidade dos efeitos observados foram confirmados pela sua anulação na presença de inibidor 172 (I172), um inibidor específico da CFTR ⁷⁸.

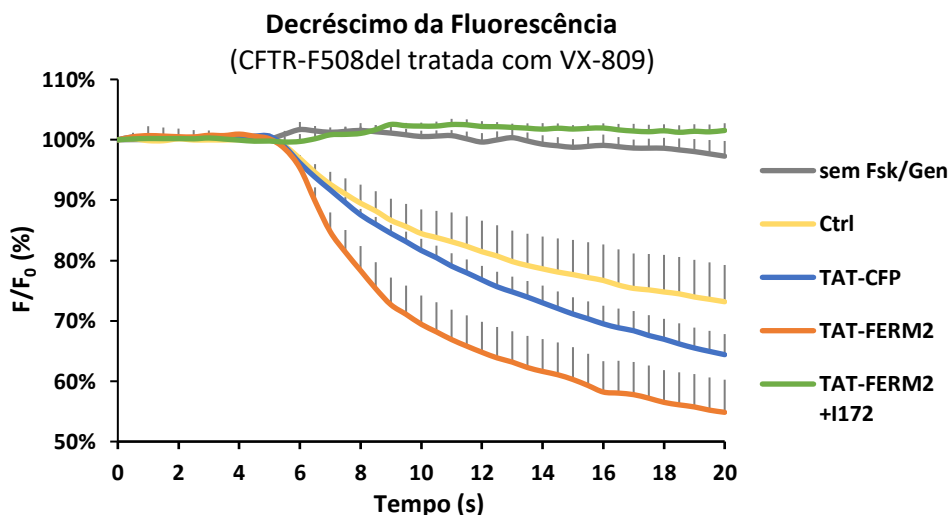


Figura 3.9 - Análise do ensaio de influxo de iodeto. As células CFBE-F508del-HS-YFP foram tratadas com 5 μ M de VX-809 a 30°C e ao fim de 24h procedeu-se a renovação do meio de cultura com meio simples ou com os meios condicionados contendo os péptidos de fusão TAT-CFP ou TAT-FERM2, conforme o pretendido, e as células foram incubadas a 37°C durante 4h. Após o tratamento com Forscolina e Genisteína (quando aplicável), na presença ou ausência do inibidor I172, realizou-se o ensaio de influxo de iodeto através da medição da intensidade de fluorescência a cada 500ms tendo sido adicionada uma solução com excesso de iodeto aos 5 segundos do ensaio (altura a partir da qual são registados os decréscimos da fluorescência). Na figura estão representados os valores médios dos três ensaios independentes realizados e o respetivo erro padrão positivo da média.

O traçado representado a amarelo na Figura 3.9, corresponde ao tratamento das células apenas com Forscolina e Genisteína e traduz assim o efeito basal da ativação do canal CFTR-F508del que permanece na membrana após a destabilização térmica de 4h a 37°C. A dependência da ativação da CFTR para este efeito é confirmada pela sua ausência no controlo negativo, traçado a cinzento, em que não foram adicionados quaisquer ativadores.

O efeito dos péptidos de fusão na atividade do canal pode ser então avaliado através da comparação entre o controlo basal (traçado a amarelo) e as condições em que, para além do tratamento com Forscolina e Genisteína, foram adicionados às células os meios que continham os péptidos de fusão TAT-CFP e TAT-FERM2 (traçados a azul e laranja, respetivamente). Como se pode observar na Figura 3.9, na presença de TAT-FERM2, mas não de TAT-CFP, verificou-se um mais rápido e mais acentuado decréscimo da intensidade de fluorescência. Isto correspondente a aumento no influxo de iodeto nestas células, consistente com uma maior retenção e abundância de CFTR-F508del funcionalmente ativa na MP. Além disso, é possível observar que o influxo de iodeto registado é diretamente consequente da atividade da CFTR-F508del uma vez que perante o uso de um inibidor específico da CFTR não se observa qualquer alteração da intensidade de fluorescência (condição representada a verde).

As curvas de decaimento da fluorescência representadas na Figura 3.9 foram ajustadas a equações de decaimento exponencial o que possibilitou o cálculo das variações na taxa inicial de influxo de iodeto entre as várias condições, diretamente proporcionais à atividade do canal CFTR-F508del nestas células (Figura 3.10) (ver 2.6.1 e ⁷¹).

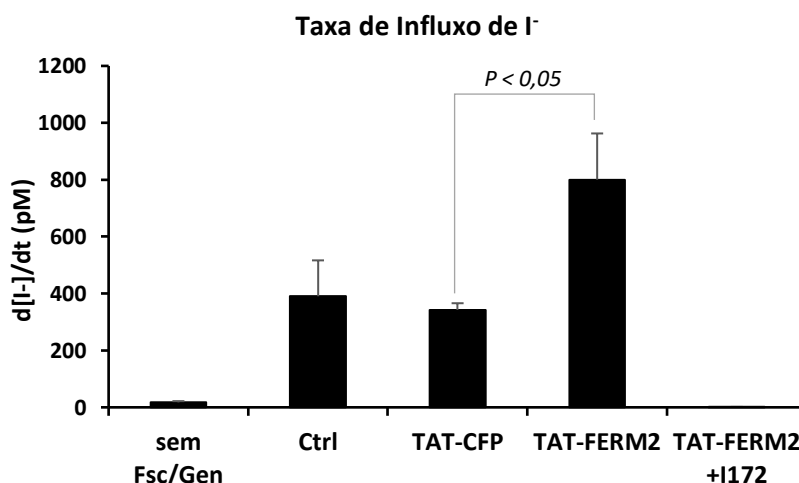


Figura 3.10 - Taxas iniciais de influxo do iodeto. As taxas de influxo foram calculadas como descrito em 2.6.1 a partir do declive de curvas de decaimento exponencial ajustadas ao decréscimo de fluorescência (Figura 3.9) (onde foi aplicando um ajuste de decaimento exponencial) através da equação $d[I^-]/dt = K_d [d(F/F_0)/dt]$, onde K_d é a constante de afinidade do YFP ao I⁻ e F/F_0 é a razão entre a intensidade de fluorescência medida num dado tempo e a intensidade de fluorescência inicial. Na figura estão representados os valores médios dos três ensaios independentes realizados e o respetivo erro padrão da média. A análise estatística foi realizada recorrendo ao teste T de Student.

Pela Figura 3.10 podemos concluir que há um aumento significativo do transporte iónico do canal CFTR-F508del quando as células são tratadas com meio que contém o péptido de fusão TAT-FERM2, reforçando assim que o TAT-FERM2, de facto, promove a estabilização do canal resgatado farmacologicamente na superfície das células CFBE.

3.2.5 Clones estáveis dos péptidos de fusão em células HEK 293

Depois de confirmada a viabilidade da estratégia de entrega da proteína recombinante TAT-FERM2 e do seu potencial estabilizador da CFTR-F508del na MP em conjunto com o tratamento com o VX-809, a etapa final deste trabalho consistiu na criação de clones estáveis de HEK 293 que expressassem e secretassem constitutivamente este péptido de fusão. Deste modo, seria possível uma produção bastante mais eficiente e contínua de TAT-FERM2, que poderia ser ainda purificado a partir dos meios de cultura recolhidos.

Numa etapa inicial foi necessário estudar a concentração de Higromicina B necessária para seleccionar as células transfetadas e, conseqüentemente, levar à morte das restantes. Para tal, foram colocadas em cultura 4×10^5 células HEK 293 por cada poço de uma placa 6-well com quantidades crescentes de Higromicina B, num intervalo de 0 a 400 µg/ml. O meio de cultura foi renovado a cada 3 a 4 dias e o crescimento celular foi observado durante 15 dias. A partir deste teste concluiu-se que a concentração necessária e suficiente de Higromicina B para seleccionar as células seria 200 µg/ml.

Posteriormente, as células HEK 293 foram então transfetadas com os péptidos de fusão TAT-CFP (controlo) e TAT-FERM2 e os clones seleccionados durante 8 dias com o antibiótico Higromicina B. Os clones que sobreviveram foram posteriormente isolados e analisados por WB a fim de verificar os respetivos níveis de expressão estável conseguida.

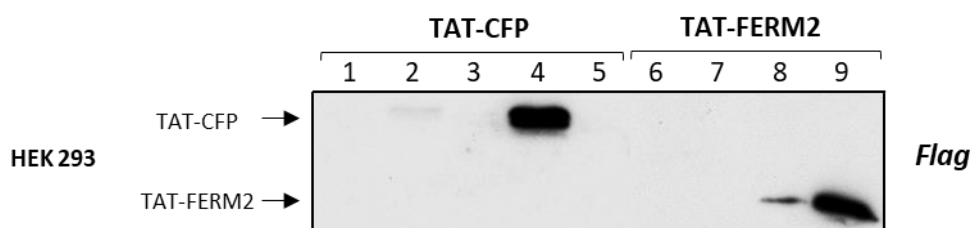


Figura 3.11 - Análise dos níveis de expressão dos péptidos de fusão, TAT-CFP e TAT-FERM2, dos clones estáveis de HEK 293 por WB. Para a deteção foi utilizado o anticorpo anti-Flag.

Foi então possível analisar a eficácia da transfeção estável e identificar os clones que expressavam quantidades detetáveis dos péptidos de fusão TAT-CFP e TAT-FERM2. Assim, foi preservado um clone estável que expressa TAT-CFP (Figura 3.11, nº 4) e os dois clones estáveis apresentados que expressam o péptido de fusão TAT-FERM2 (com diferentes níveis de expressão (Figura 3.11, nºs 8 e 9). Os clones foram então colocados em cultura e de seguida criopreservados para utilização futura.

3.3 Estudo do sensor de FRET CFP-NHERF1 Δ PDZ1-YFP

A proteína NHERF1 é uma proteína adaptadora que medeia a estabilização da proteína CFTR na MP através da formação de um complexo macromolecular. Como já referido anteriormente, esta proteína liga-se à CFTR através dos seus domínios PDZ1 e PDZ2. No entanto, a interação com o domínio PDZ2, que o grupo de acolhimento demonstrou ser essencial para a estabilização da CFTR-F508del resgatada farmacologicamente na MP, encontra-se usualmente indisponível devido a uma interação intramolecular com o domínio C-terminal de ligação à Ezrina (EBD – *Ezrin binding domain*). Consequentemente, a dissociação desta conformação ocorre apenas quando a proteína Ezrina ativa, ou, como vimos, o seu domínio FERM2, interage com o domínio C-terminal do NHERF1 (ver Figura 1.4 e Figura 1.6). Se em testes futuros, nomeadamente com modelos animais, se verificar que a administração continuada do péptido TAT-FERM2, tiver efeitos secundários indesejados, tornar-se-á necessário encontrar formas alternativas de promover a dissociação dos domínios PDZ2 e EBD de NHERF1 para potenciar a estabilização da CFTR-F508del resgatada.

Assim, um segundo objetivo deste trabalho visou a construção de um sensor molecular que permitisse avaliar, por microscopia de fluorescência, o estado conformacional da porção C-terminal (PDZ2-EBD) proteína NHERF1, através da técnica de FRET. Com este propósito, o grupo do laboratório de acolhimento criou a deleção do domínio PDZ1 e posteriormente procedeu à fusão das proteínas fluorescentes CFP e YFP nas extremidades N-terminal e C-terminal do NHERF1 Δ PDZ1, resultando a construção de fusão CFP-NHERF1 Δ PDZ1-YFP (clonada no pEYFP-N1, Clontech). Assim, se existir interação do domínio PDZ2 com o domínio C-terminal EBD da proteína NHERF1 Δ PDZ1, as proteínas fluorescentes CFP e YFP ficarão, teoricamente, suficientemente próximas para que, aquando da excitação do CFP (a 405 nm), a sua energia de emissão de fluorescência seja transferida para a proteína YFP (FRET) que, consequentemente, é excitada (devido à sobreposição espectral) e é detetada emissão de fluorescência no seu comprimento de onda (λ) específico (Figura 3.12).

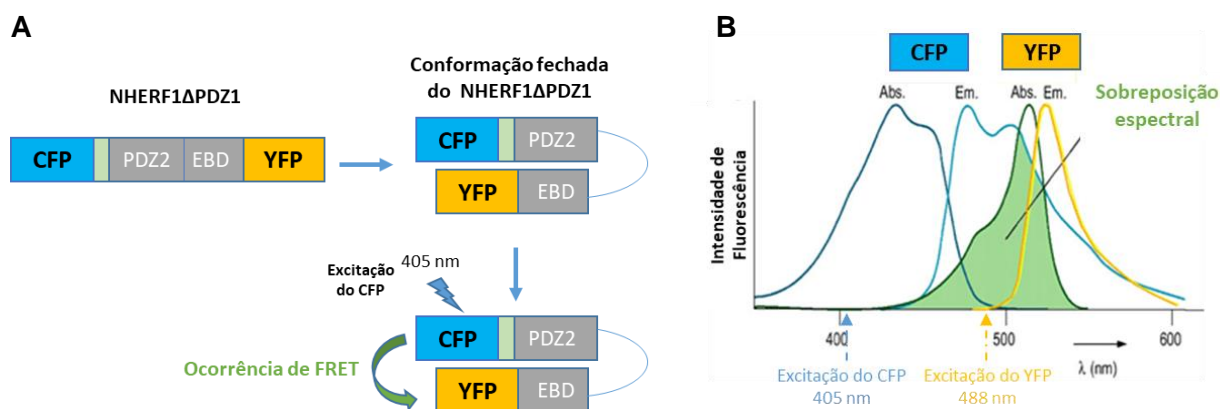


Figura 3.12 - Aplicação da técnica de FRET no estudo da conformação da proteína NHERF1 Δ PDZ1. **A)** Esquematização da construção CFP-NHERF1 Δ PDZ1-YFP e da ocorrência de FRET aquando da aquisição da conformação fechada do NHERF1 Δ PDZ1; **B)** Espectro de absorção e emissão de fluorescência das proteínas fluorescentes CFP e YFP.

Para este estudo foram utilizadas células BHK que foram transfectadas com pECFP vazio, pEYFP vazio ou com o sensor em teste CFP-NHERF1 Δ PDZ1-YFP (Figura 3.13). A transfeção com CFP e YFP funcionou como controlo, permitindo ajustar as condições de detecção espectral minimizando os artefactos de sobreposição (*bleedthrough*) que podem interferir na avaliação do FRET.

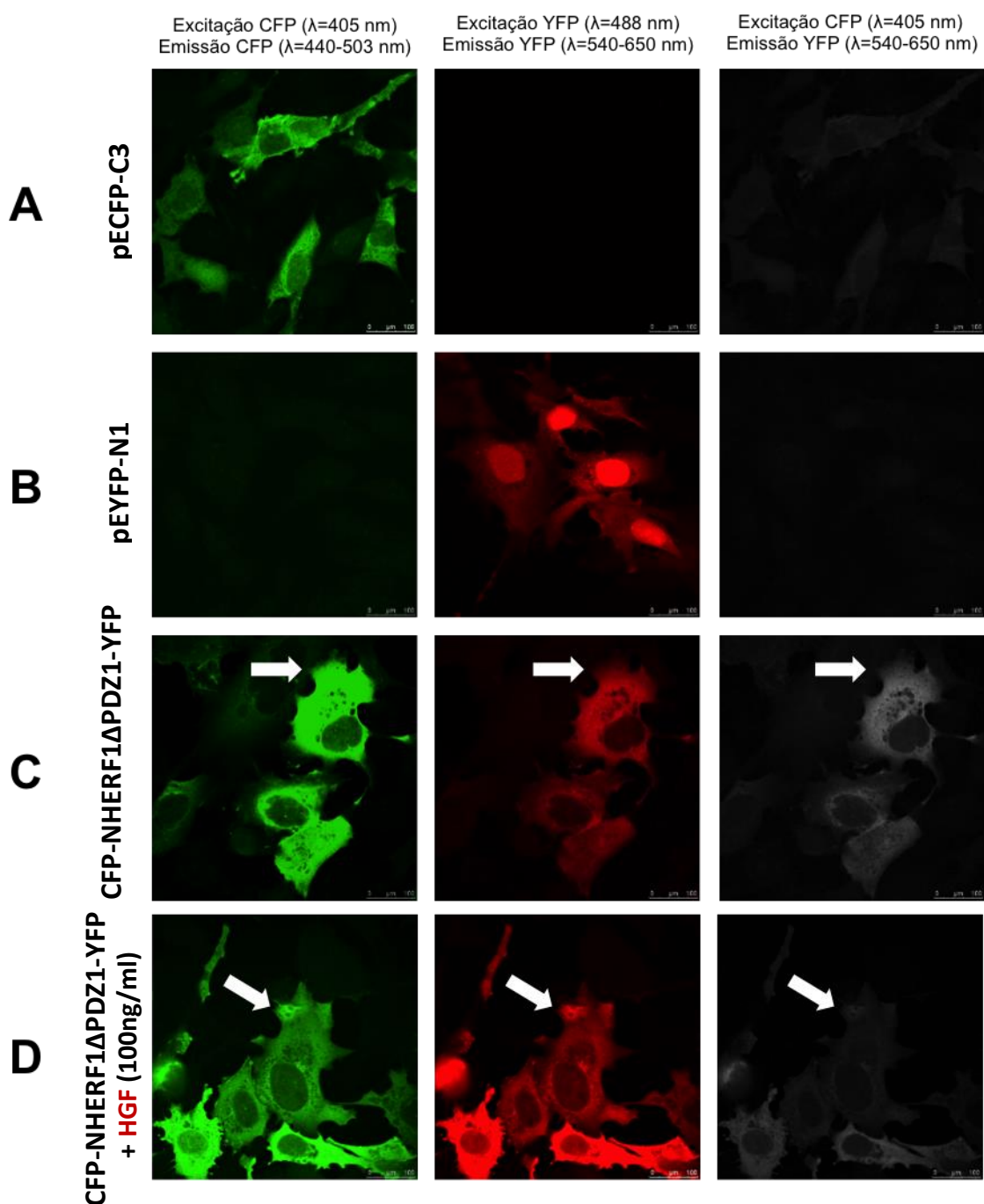


Figura 3.13 - Análise do sensor de FRET CFP-NHERF1 Δ PDZ1-YFP por microscopia de fluorescência confocal. As células BHK foram transfectadas com **A)** pECFP-C3, **B)** pEYFP-N1 e **C e D)** CFP-NHERF1 Δ PDZ1-YFP, em que em **D)** as células foram ainda tratadas com HGF (100ng/ml), durante 4h. O CFP (a verde) e o YFP (a vermelho) emitem fluorescência quando excitados a 405nm e 488nm, respetivamente. A ocorrência de FRET (a cinzento) é verificada através da excitação a 405nm com emissão de fluorescência no comprimento de onda de emissão do YFP.

Na Figura 3.13.A e B, é possível observar que as proteínas CFP e YFP apenas emitem fluorescência quando excitadas nos seus respetivos comprimentos de onda. No entanto, como há alguma sobreposição entre os espectros de emissão do CFP e YFP, verifica-se um sinal de *background* mínimo quando as células transfetadas com CFP (A) são excitadas a 405 nm e a fluorescência é lida no comprimento de onda de emissão do YFP (540-650 nm). Como para eliminar este efeito ir-se-ia perder muito do sinal emitido pelo YFP, optou-se por manter esta configuração pois observou-se que o sinal de FRET recolhido com o sensor (Figura 3.13.C) era de intensidade muito superior, tornando a interferência negligenciável.

Posteriormente, estudou-se o efeito do HGF, um fator de crescimento que o grupo de acolhimento demonstrou induzir a ativação de RAC1 e Ezrina (ver Figura 1.4), promovendo a abertura conformacional da NHERF1ΔPDZ1⁴⁰. As células BHK foram então transfetadas com CFP-NHERF1ΔPDZ1-YFP e tratadas posteriormente com 100 ng/ml de HGF (Gibco™, ThermoFisher Scientific) durante 4h. Na Figura 3.13.D observa-se que, quando comparado com o respetivo controlo (Figura 3.13.C), o tratamento com HGF induz uma perda do sinal de FRET, principalmente regiões mais “enrugadas” (*ruffled*) da membrana celular (setas brancas), que se sabe ser onde existe maior ativação de RAC1 e Ezrina, após exposição ao HGF⁴⁰. Estas observações sugerem que a NHERF1ΔPDZ1 nas proximidades da MP adquire a sua conformação aberta na presença de HGF, resultando numa perda do sinal de FRET no sensor, por afastamento das regiões N- e C-terminais de NHERF1ΔPDZ1, e logo das proteínas CFP e YFP a elas fundidas. Estes resultados são assim indicativos da funcionalidade do sensor de FRET criado. Contudo, a observação da diminuição da intensidade de FRET requer uma análise cuidada das imagens, dificultada pelo facto da proteína NHERF1ΔPDZ1 se encontrar em toda a célula e não só na MP. Este facto indica que será necessário continuar a otimizar a construção do sensor, para restringir a sua ação à MP, com vista melhoria da robustez da deteção dos efeitos, permitindo uma futura automatização do ensaio.

3.4 Estudo dos níveis de expressão de RAC1b em tecidos brônquicos derivados de doentes com FQ homozigóticos para a mutação F508del

Um último objetivo desta tese de mestrado consistiu em estudar a expressão da GTPase RAC1b em doentes homozigóticos para a mutação F508del. A RAC1b é produzida a partir do mesmo pré-mRNA que RAC1, por um evento de *splicing* alternativo que incorpora um exão adicional, codificante para 19 aminoácidos inseridos em fase, que alteram as propriedades de sinalização desta variante, ao ponto dela poder competir negativamente com RAC1^{45,79}. Uma vez que a RAC1b está extremamente associada a processos inflamatórios⁴⁴, e sendo o fenótipo de inflamação crónica uma característica da FQ, postulou-se que se houvesse sobreexpressão de RAC1b, face à RAC1, no epitélio respiratório dos doentes, esta variante poderia levar à supressão das vias de sinalização em que a RAC1 está envolvida, afetando assim o papel desta GTPase na estabilidade da CFTR-F508del na MP.

O estudo que se segue foi realizado em amostras de cDNA, gentilmente cedidas pelo laboratório da Professora Margarida Amaral (DQB, FCUL), obtidas de tecidos de epitélio brônquico de pessoas saudáveis (CFTR *wt*) e de doentes com FQ, homozigóticos para a mutação F508del (CFTR F508del^{+/+}).

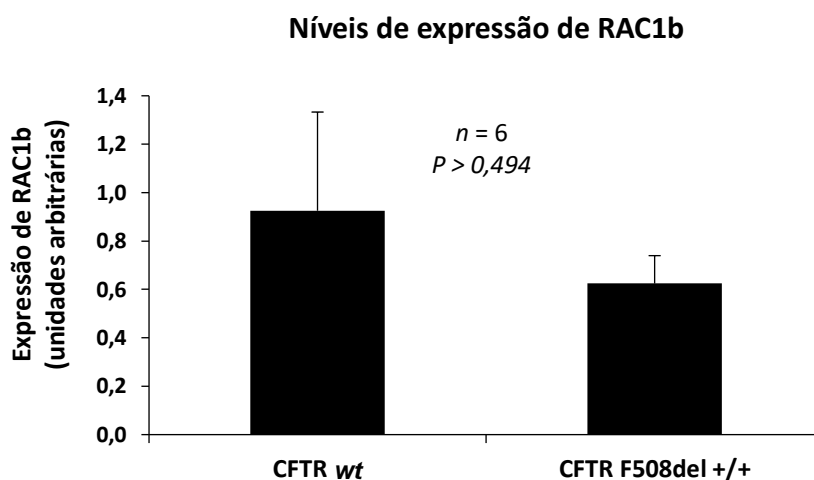


Figura 3.14 - Estudo dos níveis de expressão de RAC1b em amostras de epitélio brônquico de pessoas saudáveis (CFTR *wt*) e de doentes com FQ e homozigóticos para a mutação F508del (CFTR F508del^{+/+}). Na figura estão representados os valores médios com o respetivo erro padrão da média. A análise estatística foi realizada recorrendo ao teste T de Student.

O estudo realizado não revelou uma diferença de expressão significativa de RAC1b entre as amostras de CFTR *wt* e de CFTR F508del^{+/+}, detetando-se, quanto muito, uma expressão de RAC1b um pouco inferior nas amostras dos doentes (Figura 3.14).

No entanto, sabe-se que RAC1b só é expresso em células epiteliais, estando ausente em células do tecido de suporte⁸⁰. Como a inflamação crónica observada nestes doentes destrói progressivamente o revestimento epitelial das vias respiratórias, levantou-se a hipótese de que os níveis de RAC1b detetados nas amostras dos doentes pudessem estar subestimados devido a uma menor percentagem de células epiteliais, comparativamente com as amostras de indivíduos saudáveis. Neste sentido, foi também estimado o conteúdo epitelial das amostras através do estudo dos níveis de expressão de Citoqueratina 8 (CK8), uma proteína presente apenas em tecidos epiteliais⁸¹.

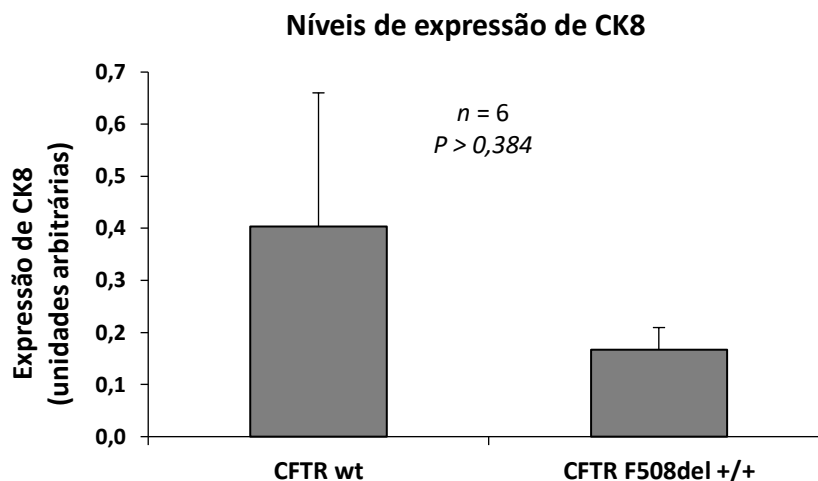


Figura 3.15 - Estudo dos níveis de expressão de CK8 em amostras de epitélio brônquico de pessoas saudáveis (CFTR *wt*) e de doentes com FQ e homozigóticos para a mutação F508del (CFTR F508del^{+/+}). Na figura estão representados os valores médios com o respetivo erro padrão da média. A análise estatística foi realizada recorrendo ao teste T de Student.

A análise dos níveis de expressão de CK8 (Figura 3.15) mostrou que, como anteriormente postulado, as amostras de pacientes com FQ apresentavam níveis de CK8 consistentes com uma baixa percentagem de células epiteliais, comparativamente com os indivíduos saudáveis. Assim, conclui-se que os níveis de RAC1b na análise anterior poderão estar de facto subestimados, pelo que a sua quantificação rigorosa implicará uma metodologia de pré-isolamento da fração epitelial nas amostras, o que está fora do âmbito do presente trabalho de mestrado.

4. Discussão dos Resultados, Conclusões e Perspetivas Futuras

A investigação intensa levada a cabo nos últimos anos conduziu à descoberta de novas moléculas capazes de corrigir alguns dos defeitos moleculares da proteína CFTR que originam a doença FQ²⁰⁻²³. Porém, no que respeita à mutação mais frequente – a F508del –, o benefício clínico alcançado pela administração dos fármacos até agora desenvolvidos foi pouco expressivo^{24,28}. A combinação do corretor VX-809 e do potenciador VX-770 foi a estratégia terapêutica mais recente que deu origem ao fármaco Orkambi®, administrado a pacientes homozigóticos para a mutação F508del com pelo menos 6 anos de idade^{28,29}. No entanto, esta terapia combinada apresenta resultados modestos na melhoria da função pulmonar, quando comparado com os resultados bastante eficazes com o tratamento do VX-770 (ivacaftor, Kalydeco®) em doentes de FQ com mutações de classe III^{28,82,83}.

O grupo de acolhimento e outros concluíram, através de diversos estudos, que um dos problemas potencialmente causais deste baixo impacto clínico é o facto dos canais F508del resgatados farmacologicamente possuírem uma muito baixa estabilidade ao nível da MP^{23,30,31,40}. O grupo de acolhimento descobriu ainda que a estabilidade da CFTR-F508del resgatada pode ser aumentada se se promover a sua interação com o segundo domínio PDZ da adaptadora NHERF1⁴¹. *In vitro*, isto foi conseguido através da sobreexpressão do domínio N-ERMAD da proteína Ezrina (ver 1.2 e Figura 1.5). Assim, o principal objetivo deste trabalho de mestrado consistiu em converter esta observação *in vitro*, numa estratégia com aplicabilidade terapêutica. A ideia de base foi, à semelhança de Nagahara *et al.* (1998)⁵⁹ e Vocero-Akbani *et al.* (1999)⁶¹, produzir um péptido bioativo que, ao ser administrado a células do epitélio respiratório dos doentes conseguisse promover a estabilização e retenção na MP da CFTR-F508del resgatada pelos fármacos atuais. Para tal, começámos por determinar qual dos três subdomínios FERM do domínio N-ERMAD da Ezrina era determinante para o efeito estabilizador *in vitro*. Através da técnica de biotinylação de proteínas da superfície celular foi possível concluir que o subdomínio FERM2 (aminoácidos 93-206 da Ezrina) é suficiente para cooperar com o fármaco VX-809 e reter a CFTR-F508del resgatada na MP.

Foi então necessário desenvolver uma estratégia que permitisse o transporte deste subdomínio para as células alvo a fim de produzir nestas o seu efeito estabilizador. Para tal foi desenvolvido um péptido recombinante com capacidade de transdução nas células, conferida pelo domínio de transdução Tat do HIV-1. Como este péptido de fusão apresentava uma baixa solubilidade em extratos de *E.coli*, a construção foi modificada para incluir a sequência-sinal da proteína prolactina, por forma a que pudesse ser produzido e secretado por células de mamífero.

Os estudos por WB confirmaram que os péptidos de fusão TAT-FERM2 e o seu controlo TAT-CFP são produzidos e secretados eficazmente por células HEK 293, incrementando com o tempo de cultura e sendo facilmente detetáveis no meio de cultura 48h após a transfeção dos plasmídeos que os codificam. Recorrendo à técnica de imunofluorescência, confirmou-se que o péptido de fusão TAT-CFP produzido em HEK é capaz de atravessar a MP das células alvo, células do epitélio brônquico (CFBE), confirmando a viabilidade da estratégia de transposição da MP por fusão com o elemento Tat. Quanto ao péptido TAT-FERM2, foi possível confirmar a sua atividade a nível da CFTR-F508del resgatada quer autocrinamente, quando foi produzido em células CFBE F508del,

quer quando produzido em células HEK e administrado ectopicamente a células CFBE F508del. Neste último caso foi possível ainda demonstrar que a adição de TAT-FERM2 possui um efeito aditivo com VX-809, aumentando em cerca de 2 vezes da atividade do canal, comparativamente com o canal apenas corrigido com o VX-809, em ensaios de influxo de iodeto. Estes dados são consistentes com uma estabilização na superfície celular da CFTR-F508del resgatada farmacologicamente pelo tratamento das células com o TAT-FERM2, o que está de acordo com o aumento da abundância de banda C observada por WB em estado estacionário.

No entanto, Flinterman *et al.* (2009) referiu que os péptidos de fusão Tat ao serem transportados através da via secretora de células de mamífero poderão ser reconhecidos por uma endoprotease expressa no RE e no complexo de Golgi. A endoprotease furina atua preferencialmente após a região de aminoácidos básicos definida por R-X-R/K-R⁸⁴ hidrolisando a proteína em questão. Deste modo, a sequência de 11 aminoácidos, maioritariamente básicos, do domínio de transdução da proteína Tat poderá estar suscetível à ação da furina uma vez que contém 2 motivos que podem ser reconhecidos por esta (o RKKR e o RQRR). A hidrólise do domínio TAT resultaria assim na perda da sua capacidade de transdução e, conseqüentemente, na inviabilidade da estratégia terapêutica aplicada neste trabalho. Assim, apesar de ter sido observado, por WB, que as células HEK foram capazes de produzir e secretar os péptidos de fusão TAT-CFP e TAT-FERM2 para o meio de cultura e, recorrendo à técnica de imunofluorescência, que o TAT-CFP secretado pelas células HEK 293 é capaz de atravessar a membrana plasmática nas células CFBE, existe a possibilidade de parte dos péptidos de fusão produzidos pelas células estejam a ser alvo de proteólise por parte da furina, o que poderá estar a reduzir a concentração de péptidos bioativos nos meios de cultura condicionados. Deste modo, e para evitar a possibilidade de ocorrer hidrólise do domínio TAT, de futuro poderá modificar-se o domínio de transdução da proteína Tat por substituição de alguns dos resíduos de Arginina e Lisinas, como referido em Flinterman *et al.*⁸⁴. Assim, poderá melhorar-se a biodisponibilidade dos péptidos de fusão secretados e com isso tornar os efeitos observados neste trabalho ainda mais evidentes. O facto de se terem conseguido clones de HEK a produzir estavelmente o péptido TAT-FERM2, permitirá, no futuro, levar a cabo a purificação e concentração dos péptidos secretados, possibilitando avaliar com maior rigor a sua ação em termos de dose-resposta e de efeito a longo prazo. Futuramente, será também necessário determinar quantitativamente se o co-tratamento da CFTR-F508del com o VX-809 e com o meio condicionado contendo TAT-FERM2 leva a um aumento do tempo de semi-vida do canal na superfície celular e correlacionar estes dados com o aumento na atividade da CFTR-F508del. Após a validação desta estratégia terapêutica *in vitro*, será então importante validar os efeitos em modelos animais, realizando estudos *in vivo* através da administração do TAT-FERM2. Este ponto pode levantar alguns problemas, pois os modelos murinos de FQ disponíveis não manifestam o fenótipo de doença respiratória e os estudos em modelos mais adequados, como os estabelecidos em furões e porcos⁸⁵, são extremamente dispendiosos e implicam infraestruturas não disponíveis ao grupo de acolhimento. Assim, eventuais estudos neste sentido implicarão o estabelecimento de colaborações com grupos internacionais que disponham destes modelos animais.

O segundo objetivo deste trabalho, visou desenvolver um método que permita, no futuro, procurar, por meio de ensaios de alto rendimento (*high-throughput*), moléculas ou compostos que possam atuar de forma equivalente, ou mais eficiente, que o péptido de

fusão TAT-FERM2. A administração de péptidos terapêuticos, apesar de terem como vantagens a elevada especificidade e a baixa toxicidade, poderá não ser viável caso provoque respostas autoimunes por parte do organismo, assim como, perante um tratamento prolongado, se for desenvolvida resistência ao fármaco. Além disso, os péptidos com aplicabilidade terapêutica poderão apresentar uma biodisponibilidade oral diminuída, decorrente da presença de peptidases no trato gastrointestinal, assim como uma absorção reduzida devido à sua elevada massa molecular e, em geral, uma baixa lipofilicidade⁸⁶, pelo que a escolha do modo de administração é um fator importante.

O sensor de FRET desenvolvido baseou-se na alteração conformacional entre os domínios PDZ2 e EBD da proteína adaptadora NHERF1, que é o evento despoletado pelo domínio FERM da Ezrina e o fator determinante da estabilização, na superfície das células, da CFTR-F508del resgatada farmacologicamente⁴¹. Observou-se a ocorrência clara de FRET entre o CFP e o YFP fundidos, respetivamente, a N- e C-terminal do sensor NHERF1ΔPDZ1, confirmando que este possui uma conformação fechada sobre si mesmo, que aproxima as duas proteínas fluorescentes nas suas extremidades. Além disso, e tal como esperado, esta conformação é revertida em torno da MP na presença HGF, que ao ativar indiretamente a Ezrina promove a disrupção da interação intramolecular entre o domínio PDZ2 e EBD do NHERF1ΔPDZ1, conduzindo ao afastamento entre o CFP e o YFP adjacentes, logo reduzindo a eficiência da transferência de energia (sinal de FRET).

No entanto, observou-se que uma eventual quantificação dos efeitos observados seria difícil de automatizar pois a perda de sinal ocorre predominantemente a nível da MP embora o sensor se encontre distribuído por toda a célula. Neste sentido, como abordagem futura, irá ser adicionado à extremidade do sensor um motivo CAAX da proteína K-RAS que foi descrito por Fivaz & Meyre (2005)⁸⁷. Este motivo é sensível a modificações por prenilação, o torna a proteína em causa altamente hidrofóbica, o que, teoricamente, irá forçar o sensor a localizar-se predominantemente na MP⁸⁷. Espera-se, assim, limitar os eventos de FRET à região alvo facilitando a análise automática e quantificação dos dados em ensaios de alto rendimento.

Finalmente, o estudo dos níveis de expressão de RAC1b em tecidos epiteliais brônquicos de doentes com FQ homozigóticos para a mutação F508del foi um último objetivo do presente trabalho. Esta variante de *splicing* do RAC1 encontra-se extremamente associada a processos inflamatório⁴⁴ e quando sobreexpressa compete com a RAC1 interferindo negativamente com a sinalização a montante desta^{45,79}. Deste modo, e tendo em conta que a FQ é também caracterizada por processos de inflamação crónica ao nível das vias respiratórias, a sobreexpressão de RAC1b em pulmões FQ poderia contribuir para a destabilização da CFTR-F508del na MP, por regulação negativa da ativação endógena da Ezrina pelo RAC1 (ver Figura 1.4). Revelou-se assim pertinente o estudo da expressão desta variante de *splicing* em tecidos de epitélio brônquico de doentes com FQ, homozigóticos para a mutação F508del (CFTR F508del^{+/+}), face a indivíduos saudáveis (CFTR *wt*).

Apesar de não ter sido detetada alteração significativa dos níveis de expressão de RAC1b entre tecidos CFTR *wt* e CFTR F508del^{+/+}, os resultados obtidos poderão estar subestimados uma vez que o RAC1b é expresso em tecidos epiteliais e o nosso estudo ter revelado também um grande prejuízo do conteúdo epitelial das amostras CFTR F508del^{+/+}, comparativamente com os tecidos obtidos de pessoas saudáveis. Assim, para obviar este

problema e ser possível, no futuro, realizar-se uma análise estrita da relação entre a RAC1b e a FQ, poderá, por exemplo, proceder-se ao isolamento das células epiteliais nas amostras, recorrendo, a técnicas de microdissecção, ou, alternativamente à avaliação da expressão *in situ*, pela técnica de imunohistoquímica, caso os anticorpos disponíveis o permitam.

Em suma, os objetivos propostos para este trabalho de mestrado foram maioritariamente cumpridos. Inicialmente, a estratégia desenvolvida, com base na construção de um péptido bioativo com o domínio de transdução da Tat e o subdomínio FERM2, demonstrou resultados favoráveis na estabilização membranar e na atividade da CFTR-F508del corrigida com o VX-809, evidenciando assim o seu potencial de aplicabilidade terapêutica - desde que validada em ensaios *in vivo*. Além disso, os resultados obtidos com o sensor de FRET mostraram também que este poderá vir a ser utilizado no estudo de outros compostos que estabilizem a CFTR-F508del através da disponibilização do domínio PDZ2 da NHERF1, apesar de no futuro ser ainda necessária a adição de um domínio CAAX ao sensor para que este se localize apenas na MP com a finalidade de permitir quantificar de forma fidedigna os efeitos em ensaios de alto rendimento. No que diz respeito ao estudo dos níveis de expressão de RAC1b em tecidos epiteliais brônquicos de doentes com FQ homozigóticos para a mutação F508del, não foi possível realizar uma análise conclusiva devido ao reduzido conteúdo epitelial das amostras CFTR F508del^{+/+}. No entanto, os resultados obtidos sugerem que, utilizando metodologias mais adequadas, talvez seja possível perceber se a expressão de RAC1b poderá ou não estar alterada nos pulmões destes doentes, e talvez contribuir indiretamente para a sua fraca resposta às terapêuticas atuais.

5. Referências Bibliográficas

1. Rommens, J. M. *et al.* Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Chromosome Walking and Jumping. *Res. Artic.* **122**, 1059–1065 (1989).
2. Riordan, J. R. *et al.* Identification the Cystic Fibrosis Gene: Cloning and Characterization of Complementary DNA. *Science (80-.)*. **245**, 1066–1073 (1989).
3. Anderson, M. P. *et al.* Demonstration That CFTR Is a Chloride Channel by Alteration of Its Anion Selectivity. *Science (80-.)*. **253**, 202–205 (1991).
4. Silva, A., Amorim, A., Azevedo, P., Lopes, C. & Gamboa, F. Cystic fibrosis - characterization of the adult population in Portugal. *Rev. Port. Pneumol.* **22**, 141–145 (2016).
5. O’Sullivan, B. P. & Freedman, S. D. Cystic fibrosis. *Lancet* **373**, 1891–1904 (2009).
6. Farinha, C. M. & Matos, P. Repairing the basic defect in cystic fibrosis - one approach is not enough. *FEBS J.* **283**, 246–264 (2016).
7. Bell, S. C., Boeck, K. De & Amaral, M. D. New pharmacological approaches for cystic fibrosis: Promises, progress, pitfalls. *Pharmacol. Ther.* **145**, 19–34 (2015).
8. Rowe, S. M., Miller, S. & Sorscher, E. J. Cystic Fibrosis. *N. Engl. J. Med.* **352**, 1992–2001 (2005).
9. Noone, P. G. & Knowles, M. R. ‘CFTR-opathies’: disease phenotypes associated with cystic fibrosis transmembrane regulator gene mutations. *Respir. Res.* **2**, 328–332 (2001).
10. Sheppard, D. N. & Welsh, M. J. Structure and Function of the CFTR Chloride Channel. *Physiol. Rev.* **79**, 23–45 (1999).
11. Gregory, R. J. *et al.* Expression and characterization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Nature* **347**, 382–386 (1990).
12. Cheng, S. H. *et al.* Defective Intracellular Transport and Processing of CFTR Is the k/lolecular Basis of Most Cystic Fibrosis. *Cell* **63**, 827–834 (1990).
13. Amaral, M. D. & Farinha, C. M. Rescuing Mutant CFTR: A Multi-task Approach to a Better Outcome in Treating Cystic Fibrosis. *Curr. Pharm. Des.* **19**, 3497–3508 (2013).
14. Wang, Y., Wrennall, J. A., Cai, Z., Li, H. & Sheppard, D. N. Understanding how cystic fibrosis mutations disrupt CFTR function: From single molecules to animal models. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **52**, 47–57 (2014).
15. Amaral, M. D. & Kunzelmann, K. Molecular targeting of CFTR as a therapeutic approach to cystic fibrosis. *Trends Pharmacol. Sci.* **28**, 334–341 (2007).
16. Thibodeau, P. H., Brautigam, C. A., Machius, M. & Thomas, P. J. Side chain and backbone contributions of Phe508 to CFTR folding. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 10–16 (2005).
17. Denning, G. M. *et al.* Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. *Nature* **358**, 761–764 (1992).
18. Lukacs, G. L. *et al.* The $\Delta F508$ Mutation Decreases the Stability of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator in the Plasma Membrane. *J. Biol. Chem.* **268**, 21592–21598 (1993).

19. Sharma, M., Benharouga, M., Hu, W. & Lukacs, G. L. Conformational and Temperature-sensitive Stability Defects of the $\Delta F508$ Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator in Post-endoplasmic Reticulum Compartments. *J. Biol. Chem.* **276**, 8942–8950 (2001).
20. Pedemonte, N. *et al.* Small-molecule correctors of defective $\Delta F508$ -CFTR cellular processing identified by high-throughput screening. *J. Clin. Invest.* **115**, 2564–2571 (2005).
21. Yang, H. *et al.* Nanomolar Affinity Small Molecule Correctors of Defective $\Delta F508$ -CFTR Chloride Channel Gating. *J. Biol. Chem.* **278**, 35079–35085 (2003).
22. Van Goor, F. & Straley, K. Rescue of $\Delta F508$ -CFTR trafficking and gating in human cystic fibrosis airway primary cultures by small molecules. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **290**, L1117–L1130 (2006).
23. Van Goor, F. *et al.* Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 18843–18848 (2011).
24. Clancy, J. P. *et al.* Results of a phase IIa study of VX-809, an investigational CFTR corrector compound, in subjects with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTR mutation. *Thorax* **67**, 12–18 (2012).
25. Brewington, J. J., McPhail, G. L. & Clancy, J. P. Lumacaftor alone and combined with ivacaftor: preclinical and clinical trial experience of F508del CFTR correction. *Expert Rev. Respir. Med.* **10**, 5–17 (2016).
26. Wainwright, C. E. *et al.* Lumacaftor–Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR. *N. Engl. J. Med.* **373**, 220–231 (2015).
27. Elborn, J. S. *et al.* Efficacy and safety of lumacaftor/ivacaftor combination therapy in patients with cystic fibrosis homozygous for Phe508del CFTR by pulmonary function subgroup: a pooled analysis. *Lancet Respir. Med.* **4**, 617–626 (2016).
28. Cholon, D. M., Esther, C. R. & Gentsch, M. Efficacy of lumacaftor-ivacaftor for the treatment of cystic fibrosis patients homozygous for the F508del-CFTR mutation. *Expert Rev. Precis. Med. Drug Dev.* **1**, 235–243 (2016).
29. Guevara, M. T. & McColley, S. A. The safety of lumacaftor and ivacaftor for the treatment of cystic fibrosis. *Expert Opin. Drug Saf.* (2017). doi:10.1016/j.actatropica.2008.08.004
30. He, L. *et al.* Correctors of $\Delta F508$ CFTR restore global conformational maturation without thermally stabilizing the mutant protein. *FASEB J.* **27**, 536–545 (2013).
31. Farinha, C. M. *et al.* Revertants, Low Temperature, and Correctors Reveal the Mechanism of F508del-CFTR Rescue by VX-809 and Suggest Multiple Agents for Full Correction. *Chem. Biol.* **20**, 943–955 (2013).
32. Haggie, P. M., Kim, J. K., Lukacs, G. L. & Verkman, A. S. Tracking of Quantum Dot-labeled CFTR Shows Near Immobilization by C-Terminal PDZ Interactions. *Mol. Biol. Cell* **17**, 4937–4945 (2006).
33. Short, D. B. *et al.* An Apical PDZ Protein Anchors the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator to the Cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* **273**, 19797–19801 (1998).
34. Li, J., Dai, Z., Jana, D., Callaway, D. J. E. & Bu, Z. Ezrin Controls the Macromolecular Complexes Formed between an Adapter Protein Na⁺/H⁺ Exchanger Regulatory Factor and the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. *J. Biol. Chem.* **280**, 37634–37643 (2005).

35. Jaffe, A. B. & Hall, A. RHO GTPases: Biochemistry and Biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**, 247–269 (2005).
36. Barr, F. A. Rab GTPase function in Golgi trafficking. *Semin. Cell Dev. Biol.* **20**, 780–783 (2009).
37. Ridley, A. J. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol.* **16**, 522–529 (2006).
38. Farinha, C. M., Matos, P. & Amaral, M. D. Control of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator membrane trafficking: not just from the endoplasmic reticulum to the Golgi. *FEBS J.* **280**, 4396–4406 (2013).
39. Wittinghofer, A. & Nassar, N. How Ras-related proteins talk to their effectors. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 488–491 (1996).
40. Moniz, S. *et al.* HGF Stimulation of Rac1 Signaling Enhances Pharmacological Correction of the Most Prevalent Cystic Fibrosis Mutant F508del-CFTR. *ACS Chem. Biol.* **8**, 432–442 (2013).
41. Loureiro, C. A. *et al.* A molecular switch in the scaffold NHERF1 enables misfolded CFTR to evade the peripheral quality control checkpoint. *Sci. Signal.* **8**, ra48 (2015).
42. Kazanietz, M. G. & Caloca, M. J. The Rac GTPase in Cancer: From Old Concepts to New Paradigms. *Cancer Res.* canres.1456.2017 (2017). doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-1456
43. Jordan, P., Brazão, R., Boavida, M. G., Gespach, C. & Chastre, E. Cloning of a novel human Rac1b splice variant with increased expression in colorectal tumors. *Oncogene* **18**, 6835–6839 (1999).
44. Matos, P. *et al.* Ibuprofen Inhibits Colitis-Induced Overexpression of Tumor-Related Rac1b. *Neoplasia* **15**, 102–111 (2013).
45. Matos, P. & Jordan, P. Expression of Rac1b stimulates NF- κ B-mediated cell survival and G1/S progression. *Exp. Cell Res.* **305**, 292–299 (2005).
46. Algrain, M., Turunen, O., Vaheri, A., Louvard, D. & Arpin, M. Ezrin Contains Cytoskeleton and Membrane Binding Domains Accounting for its Proposed Role as a Membrane-Cytoskeletal Linker. *J. Cell Biol.* **120**, 129–139 (1993).
47. Turunen, O., Wahlström, T. & Vaheri, A. Ezrin Has a COOH-Terminal Actin-binding Site That Is Conserved in the Ezrin Protein Family. *J. Cell Biol.* **126**, 1445–1453 (1994).
48. Fiévet, B., Louvard, D. & Arpin, M. ERM proteins in epithelial cell organization and functions. *Biochim. Biophys. Acta* **1773**, 653–660 (2007).
49. Gary, R. & Bretscher, A. Ezrin Self-Association Involves Binding of an N-Terminal Domain to a Normally Masked C-Terminal Domain that Includes the F-Actin Binding Site. *Mol. Biol. Cell* **6**, 1061–1075 (1995).
50. Fievet, B. T. *et al.* Phosphoinositide binding and phosphorylation act sequentially in the activation mechanism of ezrin. *J. Cell Biol.* **164**, 653–659 (2004).
51. Frankel, A. D. & Pabo, C. O. Cellular Uptake of the Tat Protein from Human Immunodeficiency Virus. *Cell* **55**, 1189–1193 (1988).
52. Green, M. & Loewenstein, P. M. Autonomous Functional Domains of Chemically Synthesized Human Immunodeficiency Virus Tat Trans-Activator Protein. *Cell* **55**, 1179–1188 (1988).
53. Mann, D. A. & Frankel, A. D. Endocytosis and targeting of exogenous HIV-1 Tat protein. *EMBO J.* **10**, 1733–1739 (1991).

54. Zahid, M. & Robbins, P. D. Protein Transduction Domains: Applications for Molecular Medicine. *Curr. Gene Ther.* **12**, 374–380 (2012).
55. Fawell, S. *et al.* Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 664–668 (1994).
56. Vivès, E., Brodin, P. & Lebleus, B. A Truncated HIV-1 Tat Protein Basic Domain Rapidly Translocates through the Plasma Membrane and Accumulates in the Cell Nucleus. *J. Biol. Chem.* **272**, 16010–16017 (1997).
57. Ruben, S. *et al.* Structural and Functional Characterization of Human Immunodeficiency Virus tat Protein. *J. Virol.* **63**, 1–8 (1989).
58. Pepinsky, R. B., Androphy, E. J., Corina, K., Brown, R. & Barsoum, J. Specific Inhibition of a Human Papillomavirus E2 Trans-Activator by Intracellular Delivery of Its Repressor. *DNA Cell Biol.* **13**, 1011–1019 (1994).
59. Nagahara, H. *et al.* Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27Kip1 induces cell migration. *Nat. Med.* **4**, 1449–1452 (1998).
60. Wadia, J. S. & Dowdy, S. F. Transmembrane delivery of protein and peptide drugs by TAT-mediated transduction in the treatment of cancer. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 579–596 (2005).
61. Vocero-Akbani, A. M., Heyden, N. Vander, Lissy, N. A., Ratner, L. & Dowdy, S. F. Killing HIV-infected cells by transduction with an HIV protease-activated caspase-3 protein. *Nat. Med.* **5**, 29–33 (1999).
62. Schwarze, S. R., Ho, A., Vocero-Akbani, A. M. & Dowdy, S. F. In Vivo Protein Transduction: Delivery of a Biologically Active Protein into the Mouse. *Science* (80-.). **285**, 1569–1572 (1999).
63. Wilson, K. & Walker, J. *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology*. Cambridge University Press (2010).
64. Phelan, K. & May, K. M. Basic Techniques in Mammalian Cell Tissue Culture. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **66**, 1.1.1-1.1.22 (2015).
65. Davis, J. M. *Basic Techniques and Media, the Maintenance of Cell Lines, and Safety*. *Animal Cell Culture: Essential Methods* (2011). doi:10.1002/9780470669815.ch4
66. Kim, T. K. & Eberwine, J. H. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal. Bioanal. Chem.* **397**, 3173–3178 (2010).
67. Holme, D. J. & Peck, H. *Analytical Biochemistry*. (Pearson, 1998). doi:10.1038/187558c0
68. Kurien, B. T. & Scofield, R. H. Western blotting. *Methods* **38**, 283–293 (2006).
69. Elia, G. Biotinylation reagents for the study of cell surface proteins. *Proteomics* **8**, 4012–4024 (2008).
70. Jayaraman, S., Haggie, P., Wachter, R. M., Remington, S. J. & Verkman, A. S. Mechanism and Cellular Applications of a Green Fluorescent Protein-based Halide Sensor. *J. Biol. Chem.* **275**, 6047–6050 (2000).
71. Galletta, L. J. V., Haggie, P. M. & Verkman, A. S. Green fluorescent protein-based halide indicators with improved chloride and iodide affinities. *FEBS Lett.* **499**, 220–224 (2001).
72. Nagai, T. *et al.* A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat. Biotechnol.* **20**, 87–90 (2002).
73. Hamada, K. *et al.* Structural basis of the membrane-targeting and unmasking mechanisms of the radixin FERM domain. *EMBO J.* **19**, 4449–4462 (2000).

74. Duarte, A. G. Estudos dos efeitos do tratamento com rhHGF de células epiteliais brônquicas derivadas de doentes com fibrose quística: avaliação das propriedades regenerativas versus oncogénicas. (Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Tese de Mestrado, 2015).
75. Ehrhardt, C. *et al.* Towards an in vitro model of cystic fibrosis small airway epithelium: characterisation of the human bronchial epithelial cell line CFBE41o-. *Cell Tissue Res.* **323**, 405–415 (2006).
76. Illek, B. *et al.* Cl Transport in Complementated CF Bronchial Epithelial Cells Correlates with CFTR mRNA Expression Levels. *Cell. Physiol. Biochem.* **22**, 57–68 (2008).
77. Diaz, A. A. *et al.* Prediction of Protein Solubility in Escherichia coli Using Logistic Regression. *Biotechnol. Bioeng.* **105**, 374–383 (2010).
78. Ma, T. *et al.* Thiazolidinone CFTR inhibitor identified by high-throughput screening blocks cholera toxin-induced intestinal fluid secretion. *J. Clin. Invest.* **110**, 1651–1658 (2002).
79. Matos, P., Collard, J. G. & Jordan, P. Tumor-related Alternatively Spliced Rac1b Is Not Regulated by Rho-GDP Dissociation Inhibitors and Exhibits Selective Downstream Signaling. *J. Biol. Chem.* **278**, 50442–50448 (2003).
80. Matos, P. *et al.* Small GTPase Rac1: Structure, Localization, and Expression of the Human Gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **277**, 741–751 (2000).
81. Chu, P. G. & Weiss, L. M. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology* **40**, 403–439 (2002).
82. Konstan, M. W. *et al.* Assessment of safety and efficacy of long-term treatment with combination lumacaftor and ivacaftor therapy in patients with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTR mutation (PROGRESS): a phase 3, extension study. *Lancet Respir. Med.* **5**, 107–118 (2017).
83. Schneider, E. K., Reyes-Ortega, F., Li, J. & Velkov, T. Can Cystic Fibrosis Patients Finally Catch a Breath With Orkambi? *Clin. Pharmacol. Ther.* **101**, 130–141 (2017).
84. Flinterman, M. *et al.* Delivery of Therapeutic Proteins as Secretable TAT Fusion Products. *Mol. Ther. Am. Soc. Gene Ther.* **17**, 334–342 (2009).
85. Keiser, N. W. & Engelhardt, J. F. New animal models of cystic fibrosis: what are they teaching us? *Curr. Opin. Pulmonary Med.* **17**, 478–483 (2011).
86. Bruno, B. J., Miller, G. D. & Lim, C. S. Basics and recent advances in peptide and protein drug delivery. *Ther. Deliv.* **4**, 1443–1467 (2013).
87. Fivaz, M. & Meyer, T. Reversible intracellular translocation of KRas but not HRas in hippocampal neurons regulated by Ca²⁺/calmodulin. *J. Cell Biol.* **170**, 429–441 (2005).

6. Anexos

6.1 Primers utilizados ao longo do trabalho

Tabela 6.1 - Sequências dos *primers* utilizados nos PCR para avaliar os níveis de expressão de RAC1b e CK8 e respectivas temperaturas de *annealing* e número de ciclos utilizados.

<i>Primer</i>	Sequência	Temperatura de <i>annealing</i>	Número de ciclos
Rac1/Rac1b_Fw	5'-GGATCCTTTGACAATTATTCTGCCAATG-3'	60°C	33
Rac1/Rac1b_Rv	5' - CGGACATTTTCAAATGATGCAGG - 3'		
CK8_Fw	5' - GCGGCAGCTGCGTGAGTACC - 3'	62°C	30
CK8_Rv	5' - CCCAGACTCCAGCCGGCTCT - 3'		

Tabela 6.2 - Sequências dos *primers* utilizados na amplificação do CFP para a clonagem no vector pCR™2.1-TOPO® e respectivas temperaturas de *annealing* e número de ciclos realizado. A sublinhado constam as sequências reconhecidas pelas endonucleases a utilizar no processo final de clonagem.

<i>Primer</i>	Sequência	Temperatura de <i>annealing</i>	Número de ciclos
CFP_XhoI_Fw	5' - <u>CTCGAGATGGT</u> GAGCAAGGGCGA - 3'	67°C	34
CFP_SmaI_Rv	5' - <u>CCCGGGTCACTTGTACAGCTCGTC</u> - 3'		

Tabela 6.3 - Sequências dos *primers* utilizados nas etapas de *screening* das clonagens e respectivas temperaturas de *annealing* e número de ciclos realizado.

<i>Primer</i>	Sequência	Temperatura de <i>annealing</i>	Número de ciclos
PCMV5-1F	5' - GGGACTTTCCAAAATGTCGTA - 3'	58°C /60°C	35
PFGH-R1	5' - TTTATTAGGAAAGGACAGTGGG - 3'	60°C	

Tabela 6.4 - Sequências dos *primers* utilizados nas reações de sequenciação e respectivas temperaturas de *annealing* e número de ciclos realizado.

<i>Primer</i>	Sequência	Temperatura de <i>annealing</i>	Número de ciclos
M13	5' - GGAAACAGCTATGACCATG - 3'	52°C	25
PCMV5-1F	5' - GGGACTTTCCAAAATGTCGTA - 3'	56°C	
PFGH-R1	5' - TTTATTAGGAAAGGACAGTGGG - 3'	58°C	

6.2 Construção do péptido de fusão TAT-FERM2

Constituição da sequência TAT:



Sequência codificante para o péptido de fusão TAT-FERM2:

AAGCTTGCTAGCGCCACCATGGGAAACATTAAAGGCAGCCCGTGGAAAGGCAGCCTGCTGCT
GCTGCTGGTGAGCAACCTGCTGCTGTGCCAGAGCGTGGCGCCGTATGGCCGCAAAAAACGCC
GCCAGCGCCGCCGCCATCATCATCATCATGATTATAAAGATGATGATGATAAAGGCGGC
AGCGGCGGCAGCCTCGAGATGCTCATCCAGGACATCACCCAGAACTTTTCTTCCTCCAAGT
GAAGGAAGGAATCCTTAGCGATGAGATCTACTGCCCCCTGAGACTGCCGTGCTCTTGGGGT
CCTACGCTGTGCAGGCCAAGTTTGGGGACTACAACAAAGAAGTGCACAAGTCTGGGTACCTC
AGCTCTGAGCGGCTGATCCCTCAAAGAGTGATGGACCAGCACAACTTACCAGGGACCAGTG
GGAGGACCGGATCCAGGTGTGGCATGCGGAACACCGTGGGATGCTCAAAGATAATGCTATGT
TGAATACCTGAAGATTGCTCAGGACCTGGAAATGTATTGACCCGGGTCTAGA